

**Universidade Federal de Pelotas**  
**Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”**  
**Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**



Tese

**Respostas bioquímicas, metabólicas e moleculares de genótipos de pimenta  
(*Capsicum baccatum*) com níveis distintos de pungência cultivados sob déficit  
hídrico**

**Bianca Camargo Aranha**

Pelotas, 2020.

**Bianca Camargo Aranha**

**Respostas bioquímicas, metabólicas e moleculares de genótipos de pimenta  
(*Capsicum baccatum*) com níveis distintos de pungência cultivados sob déficit  
hídrico**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação: Prof. Dr. Fabio Clasen Chaves

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Pegoraro

Dr<sup>a</sup>. Rosa Lia Barbieri

Pelotas, 2020.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

A111r Aranha, Bianca Camargo

Respostas bioquímicas, metabólicas e moleculares de genótipos de pimenta (*Capsicum baccatum*) com níveis distintos de pungência cultivados sob déficit hídrico / Bianca Camargo Aranha ; Fabio Clasen Chaves, orientador ; Camila Pegoraro, Rosa Lía Barbieri, coorientadores. — Pelotas, 2020.

113 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Potencial osmótico. 2. Metabolismo geral. 3. Aminoácidos livres. 4. Metabolismo especializado. 5. Capsaicina sintase. I. Chaves, Fabio Clasen, orient. II. Pegoraro, Camila, coorient. III. Barbieri, Rosa Lía, coorient. IV. Título.

CDD : 664

Bianca Camargo Aranha

**Respostas bioquímicas, metabólicas e moleculares de genótipos de pimenta (*Capsicum baccatum*) com níveis distintos de pungência cultivados sob déficit hídrico**

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 09 de julho de 2020.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Cesar Valmor Rombaldi. Doutor em Biologia Molecular Vegetal pela Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse.

Prof. Dr. Fabio Clasen Chaves. Doutor em Biologia Vegetal pela Rutgers, The State University of New Jersey

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jessica Fernanda Hoffmann. Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel Silviana Neitzke. Doutora em Agronomia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr. Sidnei Deuner. Doutor em Agronomia (Fisiologia Vegetal) pela Universidade Federal de Lavras.

## Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar ao meu orientador, prof. Dr. Fabio Chaves, pelo conhecimento passado e pela paciência desde mestrado até a conclusão do doutorado, onde as contribuições foram muito importantes para a minha formação e desenvolvimento acadêmico.

A minha coorientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Pegoraro, pela atenção e tempo concedidos, que me adotou como orientada e me proporcionou diversas oportunidades de aprendizado, contribuindo para a conclusão da minha formação.

A minha coorientadora Dr<sup>a</sup>. Rosa Lia Barbieri, que me acolheu e proporcionou a implementação do experimento, etapa em que adquiri muito conhecimento e prática que foram significativos para minha formação.

As minhas colegas/amigas Giovana, Ellen, Rosane, Ana Clara, Jessica F., Paula, Vivian, Jessica H., Tanize, Camila e Isabel e em especial ao meu namorado Maicon Nardino, por serem peça chave durante essa etapa, agregando muito na minha vida acadêmica e pessoal. Sou mais forte por causa de vocês!

Aos todos colegas e funcionários na empresa Embrapa Clima Temperado que me ajudaram na implementação do experimento, em especial ao Henrique, Andrey e Breno.

Aos alunos de iniciação científica João e Antônio, pela disponibilidade e ajuda.

Ao prof. Dr. Sindei Deuner e Gabriele Espinel do PPG Fisiologia Vegetal – UFPel, pela ajuda, espaço cedido e realizações de análises.

A minha família, que é minha referência e amor e união, no qual o apoio incondicional sempre me ajudou a seguir em frente.

Ao meu padrasto Rafael (*In memoriam*), que me proporcionou amor, apoiando e acreditando na minha jornada de vida. Obrigada pai, sinto saudades todos os dias!

Ao departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, ao Centro de Genômica e Fitomelhoramento, a Universidade Federal de Pelotas e a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Clima Temperado), pelas instalações e equipamentos cedidos, tornando possível a realização deste trabalho.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior),  
pela concessão da bolsa.

A Secretaria de Ciência e Tecnologia do governo do Estado do Rio Grande do  
Sul pelos recursos para aquisição de equipamentos utilizados no desenvolvimento do  
projeto.

A Banca examinadora, pelas correções, sugestões e troca de conhecimentos.

A Deus pela oportunidade e força para seguir em todas as etapas.

Muito obrigada!

## Resumo

ARANHA, Bianca Camargo.

**Respostas bioquímicas, metabólicas e moleculares de genótipos de pimenta (*Capsicum baccatum*) com níveis distintos de pungência cultivados sob déficit hídrico.** 2020. 114f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A pungência em pimentas *Capsicum* é decorrente de compostos capsaicinoides, cujo conteúdo varia em função de fatores genéticos e ambientais. O efeito do déficit hídrico (DH) em pimentas, suas respostas metabólicas e o envolvimento dos capsaicinoides nessa resposta não estão bem estabelecidos. Baseado nisso, objetivou-se caracterizar as respostas moleculares, bioquímicas e metabólicas de três genótipos de pimenta (*Capsicum baccatum*), com potencial distinto de acúmulo de capsaicinoides, frente ao déficit hídrico. Genótipos com média pungência (P232), baixa pungência (P337) e sem pungência (P323) foram cultivados sob DH e sob condições ideais de irrigação em duas safras. O genótipo de média pungência não apresentou perdas significativas de massa fresca dos frutos em função do DH, sendo um indicativo que esse genótipo tolerou melhor essa condição. Esse genótipo também se diferenciou dos demais genótipos quanto ao efeito do DH sobre os teores de aminoácidos, ácidos fenólicos e capsaicinoides. O acúmulo de osmólitos ativos, observado pela redução do potencial osmótico em resposta ao DH ocorreu apenas nos genótipos pungentes (P232 e P337). Esse resultado, associado ao acúmulo de aminoácidos e açúcares sob DH exclusivamente nesses genótipos indica o envolvimento desses osmoprotetores como mecanismo de resposta a seca em pimentas pungentes. O fato dessa performance não ser observada no genótipo sem pungência leva a crer que de alguma maneira os capsaicinoides podem estar envolvidos no mecanismo de resposta a condição de DH via osmoproteção. No entanto, a expressão de *PUN1* (enzima capsaicina sintase) e o teor de capsaicinoides foram no geral reduzidos em função da condição de DH. A expressão transcricional de genes putativamente envolvidos na resposta a condições estressoras também foi afetada pelo DH. A aplicação do DH levou a redução do acúmulo de transcritos de *DREB1A* (tipo fator de transcrição elemento-ligante responsivo à desidratação) e ao aumento do acúmulo de transcritos de *ERF5* (tipo fator de transcrição responsivo ao etileno).

**Palavras-chave:** potencial osmótico; aminoácidos livres; capsaicina sintase; metabolismo geral; metabolismo especializado.

## Abstract

ARANHA, Bianca Camargo. **Biochemical, metabolic and molecular responses of pepper genotypes (*Capsicum baccatum*) with different levels of pungency grown under drought stress.** 2020. 114f. Tese (Doctor Degree in Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

The pungency in *Capsicum* peppers is due to capsaicinoid compounds, whose content varies depending on genetic and environmental factors. The effect of drought stress (DS) on peppers, their metabolic responses and the involvement in capsaicinoid biosynthesis in this response are not well established. Based on this, the objective was to characterize the molecular, biochemical and metabolic responses of three genotypes of pepper (*Capsicum baccatum*), with different potential for capsaicinoid accumulation, in the face of drought stress. Genotypes with medium pungency (P232), low pungency (P337) and non-pungent (P323) were grown under DS and under ideal conditions of irrigation in two harvest. The medium pungency genotype did not show significant losses of fresh weight of the fruits due to the DS, being an indication that this genotype tolerated this condition better. This genotype also differed from other genotypes regarding the effect of DS on the levels of amino acids, phenolic acids and capsaicinoids. The accumulation of active osmolytes, observed by the reduction of the osmotic potential in response to the DS occurred only in the pungent genotypes (P232 and P337). This result, associated with the accumulation of amino acids and sugars under DS exclusively in these genotypes indicates the involvement of these osmoprotectors as a response mechanism to drought in pungent peppers. The fact that this performance is not observed in the non-pungent genotype leads us to believe that somehow capsaicinoids may be involved in the mechanism of response to the condition of DS via osmoprotection. However, the expression of *PUN1* (capsaicin synthase enzyme) and the capsaicinoid content were generally reduced depending on the condition of DS. The transcriptional expression of genes putatively involved in the response to stressful conditions was also affected by DS. The application of the DS led to a reduction in the accumulation of *DREB1A* transcripts (type of transcription factor element-ligand responsive to dehydration) and an increase in the accumulation of *ERF5* transcripts (type of transcription factor responsive to ethylene).

**Keywords:** osmotic potential; free amino acids; capsaicin synthase; general metabolism; specialized metabolism.



## Lista de Figuras

Figura 1.	Corte transversal em pimenta ( <i>Capsicum chinense</i> )	22
Figura 2.	Representação das duas vias de biossíntese de capsaicinoides em pimenta <i>Capsicum</i> mostrando as principais enzimas e metabólitos intermediários	23
Figura 3.	Fases de resposta das plantas em condições de estresses (alarme, aclimação, manutenção e exaustão)	26
Figura 4.	Representação esquemática da transdução do sinal por vias de sinalização dependente e independente do ácido abscísico (ABA) no metabolismo de plantas em condições estressoras	30
Figura 5.	Ação das enzimas do sistema antioxidante em plantas	32
Figura 6.	Genótipos de pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) em duas condições hídricas	36
Figura 7.	Pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS	38
Figura 8.	Massa em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	56
Figura 9.	Potencial hidrogeniônico (pH) e acidez total em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	56
Figura 10.	Sólidos solúveis e ângulo HUE em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	57
Figura 11.	Interferência do déficit hídrico no acúmulo de transcritos dos genes <i>DREB1A</i> , <i>ERF5</i> e <i>PUN1</i> em frutos de <i>Capsicum baccatum</i> com distintos graus de pungência cultivados em duas safras.	59
Figura 12.	Diferença entre safras no acúmulo de transcritos dos genes <i>DREB1A</i> , <i>ERF5</i> e <i>PUN1</i> em frutos de <i>Capsicum baccatum</i> com distintos graus de pungência em condição de estresse por déficit hídrico	60
Figura 13.	Mapa de calor com os diferentes elementos cis preditos encontrados nas regiões de 1 Kb a montante dos genes <i>DREB1A</i> , <i>ERF5</i> e <i>PUN1</i>	61
Figura 14.	Glicina-betaína na folha de <i>Capsicum baccatum</i> sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	63
Figura 15.	Teor prolina e potencial osmótico em folha e fruto em <i>Capsicum baccatum</i> sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	64

Figura 16.	Atividade da enzima ascorbato peroxidase em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	65
Figura 17.	Atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase e teor de malondialdeído em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	66
Figura 18.	Atividade das enzimas superóxido dismutase e ascorbato peroxidase e teor de peróxido de hidrogênio e malondialdeído em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	67
Figura 19.	Potencial antioxidante por captura do radical ABTS (% de inibição) em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	68
Figura 20.	Potencial antioxidante por DPPH (% de inibição) em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	69
Figura 21.	Carotenoides em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	69
Figura 22.	Compostos fenólicos e ácido ascórbico total em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	70
Figura 23.	Concentração de ácido abscísico, éster glicosilado de ácido abscísico, ácido faseico e ácido dihidrofaseico em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	71
Figura 24.	Perfil de ácidos fenólicos em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	73
Figura 25.	Rutina em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	74
Figura 26.	Perfil de compostos capsaicinoides em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	75
Figura 27.	Correlação de Pearson entre <i>DREB1A</i> , <i>ERF5</i> , <i>PUN1</i> e CST para tratamento	77
Figura 28.	Correlação de Pearson entre <i>DREB1A</i> , <i>ERF5</i> , <i>PUN1</i> e CST para safra.	78
Figura 29.	Perfil de aminoácidos em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	80
Figura 30.	Concentração de aminoácidos e ácido γ-aminobutírico em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	81

Figura 31.	Concentração de alanina e ácido $\gamma$ -aminobutírico em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	82
Figura 32.	Concentração de aminoácidos e ácido $\gamma$ -aminobutírico em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	83
Figura 33.	Concentração de manitol e sacarose em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	84
Figura 34.	Concentração de glicose e xilose em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	84
Figura 35.	Concentração de glicose, frutose e xilose em pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo	85
Figura 36.	Análise de componentes principais (PCA) na dispersão de genótipos de pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo.	86

## Lista de Tabelas

Tabela 1.	Descrição de três genótipos de variedades locais de pimentas ( <i>Capsicum baccatum</i> ) do Banco Ativo de Germoplasma de Capsicum da Embrapa Clima Temperado	35
Tabela 2.	Dados climáticos da Estação Agroclimatológica de Pelotas no período de aplicação de déficit hídrico nas plantas	37
Tabela 3.	Características dos genes e iniciadores utilizados nas análises de expressão dos genes em RT-qPCR	42

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Hipóteses</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Objetivos</b>	<b>18</b>
3.1	Objetivo Geral	18
3.2	Objetivos Específicos	18
<b>4</b>	<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>20</b>
4.1	Pimentas do gênero <i>Capsicum</i>	20
4.1.1	Compostos capsaicinoides	21
4.2	Condições de estresse e fases de resposta em plantas	24
4.2.1	Déficit hídrico em plantas	26
4.2.2	Sinalização molecular na resposta ao déficit hídrico em plantas	27
4.2.3	Metabólitos de plantas em condições de estresse	30
<b>5</b>	<b>Material e Métodos</b>	<b>35</b>
5.1	Seleção dos genótipos e condição de déficit hídrico	35
5.2	Colheita e preparo amostral	36
5.3	Parâmetros de maturação e rendimento dos frutos	38
5.4	Análises moleculares	39
5.4.1	Extração do Ácido Ribonucleico total	39
5.4.2	Síntese do DNA complementar	40
5.4.3	Desenho de iniciadores para expressão gênica	41
5.4.4	Validação dos iniciadores para análise de expressão gênica	43
5.4.5	Análise de RT-qPCR para quantificação relativa de transcritos	43
5.4.6	Identificação de elementos regulatórios de ação <i>cis</i>	44
5.5	Determinação de marcadores de estresse nas folhas e frutos de pimenta	44

5.5.1	Teor de glicina-betaína	44
5.5.2	Teor de prolina	45
5.5.3	Potencial osmótico	45
5.6	Avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante e quantificação de metabólitos indicadores de estresse oxidativo em frutos de pimenta	46
5.6.1	Determinação do teor de proteínas totais	46
5.6.2	Atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase	46
5.6.3	Peroxidação lipídica e conteúdo de peróxido de hidrogênio	47
5.7	Atividade antioxidante e teor de metabólitos totais dos frutos	48
5.7.1	Potencial antioxidante	48
5.7.2	Carotenoides totais	48
5.7.3	Compostos fenólicos totais	49
5.8	Metabólitos individuais	49
5.8.1	Teor de Ácido ascórbico total	49
5.8.2	Teor de ácido abscísico e derivados	50
5.8.3	Compostos fenólicos e capsaicinoides	51
5.8.4	Teor de aminoácidos e açúcares	52
5.8.4.1	Extração e derivatização do extrato	52
5.8.4.2	Instrumentação e condições analíticas	53
5.9	Análise estatística dos dados	53
<b>6</b>	<b>Resultados</b>	<b>55</b>
6.1	Parâmetros de rendimento e maturação	55
6.2	Quantificação relativa de transcritos e regulação da transcrição dos genes DREB1A, ERF5 e PUN1	58
6.3	Caracterização das respostas bioquímicas e metabólicas das pimentas ao déficit hídrico	62
6.3.1	Metabólitos marcadores de condição de estresse	62

6.3.2	Atividade de enzimas antioxidante e metabólitos indicadores de estresse oxidativo	65
6.3.3	Atividade antioxidante e teor de metabólitos	67
6.4	Análise de componentes principais de pimentas cultivadas sob déficit hídrico	85
<b>7</b>	<b>Discussão</b>	<b>88</b>
7.1	Parâmetros de rendimento e maturação dos frutos cultivados sob déficit hídrico	88
7.2	Ajuste osmótico e metabólitos de osmoproteção em plantas cultivadas sob déficit hídrico	89
7.3	Regulação da biossíntese de capsaicinoides e da transcrição de genes associados ao déficit hídrico	92
7.4	Atividade de enzimas antioxidantes nos frutos cultivados sob déficit hídrico	97
7.5	Potencial antioxidante e teor de metabólitos em frutos cultivados sob déficit hídrico	98
<b>8</b>	<b>Considerações finais</b>	<b>101</b>
	<b>Referências bibliográficas</b>	<b>102</b>

## 1 Introdução

Pimentas *Capsicum* pertencem à família Solanaceae, e esse gênero é composto por mais de 30 espécies já relatadas, das quais cinco são domesticadas (*C. annuum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*). Originárias da América, as pimentas foram inicialmente domesticadas pelos povos nativos que as utilizavam na condimentação de alimentos e no tratamento de enfermidades (ROYS, 1931). A partir das viagens dos colonizadores europeus aos territórios que nos dias de hoje compõe os países latino-americanos, as pimentas se popularizaram como especiarias e foram inseridas na Europa e Ásia, e com isso seu cultivo e consumo se espalharam por todos os continentes. As características de cor, aroma, sabor e pungência fazem das pimentas um importante componente culinário. Além disso, plantas de pimenta são utilizadas na ornamentação e os frutos de maior pungência na elaboração de medicamentos e na indústria bélica (spray de pimenta).

A sensação de calor ou queimação causada pelo consumo de pimentas pungentes é decorrente de compostos capsaicinoides, que são exclusivos do gênero *Capsicum*. Os capsaicinoides são formados a partir de duas vias metabólicas, a dos fenilpropanoides e a dos ácidos graxos de cadeia ramificada. Nas etapas finais da biossíntese dos capsaicinoides, as enzimas aminotransferase e capsaicina sintase catalisam a formação de vanililamina e capsaicina, respectivamente (Aza-González *et al.*, 2011). Estudos com genótipo não-pungente de *Capsicum frutescens*, demonstraram que uma mutação no gene que codifica para a enzima aminotransferase (predita) resultou na perda de quatro aminoácidos, levando à extinção da atividade enzimática e à não formação de vanililamina, e consequentemente à ausência de capsaicinoides (Park *et al.*, 2015). Nestas plantas, houve a formação de capsinoides (não-pungentes) por ação da capsaicina sintase. Genótipos com essas mutações e que não acumulam capsaicinoides são chamados de pimentão ou pimenta doce.

Além de fatores genéticos, condições ambientais podem afetar o teor de capsaicinoides nos frutos. Sung *et al.* (2005) demonstraram que os teores de capsaicinoides em frutos de plantas submetidas a condições de estresse ocasionado por déficit hídrico aumentaram em até três vezes quando comparados aos teores em frutos de plantas sob condições ideais de irrigação. Em outro estudo, foi verificado que pimentas submetidas a condições de estresse ocasionado por déficit hídrico,



apresentaram maior atividade de enzimas da rota de biossíntese dos capsaicinoides (Phimchan *et al.*, 2014).

Fenômenos climáticos como *El Niño* e *La Niña* influenciam o índice de precipitação e a temperatura que consequentemente podem alterar a produtividade das culturas. Programas de melhoramento genético buscam selecionar indivíduos capazes de suportar adversidades climáticas. Nesse contexto, é fundamental compreender os mecanismos de resposta às condições estressoras. Condições adversas (bióticas ou abióticas) são percebidas pela planta e acarretam em transdução de sinalização e ativação de expressão gênica, levando a respostas bioquímicas, fisiológicas e morfológicas (Schwachtje *et al.*, 2019). Estas alterações podem ser mapeadas de modo direcionado avaliando-se compostos e rotas de interesse que sabidamente estão envolvidas nas respostas às condições adversas, ou de modo não-direcionado por estratégias ômicas de análise buscando a descoberta de respostas desconhecidas.

Sob uma condição de estresse, o metabolismo da planta é alterado, desencadeando uma cascata de reações para a manutenção da homeostase celular. Em plantas sob déficit hídrico, por exemplo, as primeiras respostas são o fechamento estomático e redução da atividade fotossintetizante (Bianchi *et al.*, 2016). Se esta condição se mantém, ocorre a formação de radicais livres em proporções maiores que quando comparado à planta em homeostase. Nessa situação, o sistema enzimático antioxidante (superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, catalase) é ativado em maiores proporções. Além das enzimas do sistema antioxidante, os teores de diversos metabólitos são alterados, incluindo aminoácidos e açúcares que apresentam propriedade osmoprotetora, atuando no ajuste osmótico, além de proteger a célula do estresse oxidativo ocasionado por espécies reativas de oxigênio (Jamaux *et al.*, 1997; Barbosa *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2019). Também tem sido reportada a participação de compostos antioxidantes (fenólicos, carotenoides, ácido ascórbico e outros) na neutralização dos radicais livres (Barbosa *et al.*, 2011).

Com base no exposto, o presente estudo buscou mapear as alterações bioquímicas, metabólicas e moleculares em três genótipos de *Capsicum baccatum*, cada qual com capacidade distinta para o acúmulo de capsaicinoides, cultivados sob condição ideal de irrigação e sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. Foram utilizadas estratégias de análise direcionada para avaliar marcadores de estresse,

compostos do metabolismo geral e especializado, incluindo a avaliação do acúmulo de capsaicinoides e expressão de genes envolvidos na biossíntese desses compostos.

## 2 Hipótese

A aplicação de déficit hídrico em *Capsicum baccatum* leva ao aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante, ao incremento do acúmulo de metabólitos gerais, como aminoácidos e açúcares, e de compostos do metabolismo especializado como capsaicinoides devido ao aumento da expressão de genes envolvidos na rota de biossíntese desses compostos.

### 3 Objetivos

#### 3.1 Objetivo Geral

Caracterizar as respostas moleculares, bioquímicas e metabólicas de três genótipos de pimenta (*Capsicum baccatum*), com potencial distinto de acúmulo de capsaicinoides, frente ao déficit hídrico.

#### 3.2 Objetivos Específicos

a) Avaliar os parâmetros de maturação e rendimento em frutos provenientes de plantas de pimenta submetidas à condição déficit hídrico e de plantas mantidas sob condições ideais de irrigação;

b) Determinar o potencial osmótico e o teor de prolina e glicina betaína em folhas e frutos de plantas de pimenta submetidas à condição déficit hídrico e em plantas mantidas sob condições ideais de irrigação;

c) Quantificar a expressão dos genes *Acyl-transferase*, *Dehydration-responsive element-binding protein 1A-like* e *Ethylene-responsive transcription factor 5-like*, em frutos de pimentas provenientes de plantas submetidas à condição de déficit hídrico e de plantas mantidas sob condições ideais de irrigação;

d) Avaliar as atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase e o teor de radicais peróxido de hidrogênio e malondialdeído a fim de elucidar o estresse oxidativo em frutos provenientes de plantas de pimenta submetidas à condição de déficit hídrico e de plantas mantidas sob condições ideais de irrigação;

e) Avaliar o potencial antioxidante em frutos provenientes de plantas de pimenta submetidas à condição déficit hídrico e de plantas mantidas sob condições ideais de irrigação;

f) Quantificar o teor de capsaicinoides, compostos fenólicos, ácido abscísico e ácido ascórbico em frutos provenientes de plantas de pimenta submetidas à condição déficit hídrico e de mantidas sob condições ideais de irrigação por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; e,

g) Quantificar o perfil de aminoácidos e açúcares em frutos provenientes de plantas de pimenta submetidas à condição déficit hídrico e de mantidas sob condições ideais de irrigação por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

## 4 Revisão Bibliográfica

### 4.1 Pimentas do gênero *Capsicum*

As pimentas do gênero *Capsicum* spp. são nativas da zona tropical úmida do continente americano, e assim como tomate (*Solanum lycopersicum*), beringela (*Solanum melongena*), batata (*Solanum tuberosum*) e tabaco (*Nicotiana tabacum*) fazem parte da família Solanaceae. Embora as plantas de *Capsicum* sejam arbustos perenes, nas regiões de clima temperado são geralmente cultivadas como plantas anuais e sua propagação é feita por sementes (Barbieri e Neitzke, 2008). Compreendem culturas de verão com faixa de temperatura ideal entre 20 e 30 °C e necessidade de água de 4 a 10mm dia<sup>-1</sup>, podendo consumir em torno de 800mm de água durante o ciclo (Embrapa, 2019). No Brasil, frutos de *Capsicum* são popularmente conhecidos por pimenta, pimenta doce ou pimentão de acordo com o grau de pungência.

Nesse gênero, aproximadamente 30 espécies já são conhecidas, das quais cinco são domesticadas (*C. annum*, *C. baccatum*, *C. chinense*, *C. frutescens* e *C. pubescens*). As espécies domesticadas surgiram em diferentes regiões do continente americano milhares de anos antes de sua colonização por povos europeus. *Capsicum annum* teve origem na América Central e México, *C. baccatum* é natural da região sul do continente Americano, *C. chinense* originou-se da região de clima tropical, *C. frutescens* surgiu nas regiões tropical e subtropical e *C. pubescens* é nativa da Cordilheira dos Andes (MARTIN *et al.*, 1979).

Povos Maias da era pré-colombiana utilizavam os frutos do gênero *Capsicum* em diversas misturas farmacológicas (ROYS,1931). As pimentas também eram utilizadas na condimentação de alimentos e em rituais de guerra. Com as navegações europeias que exploravam a diversidade de suas colônias, as pimentas, utilizadas como especiarias, foram inseridas na Europa, África e Ásia (Barbieri e Neitzke, 2008).

Segundo dados da FAOSTAT, a produção mundial de pimenta *in natura* do gênero *Capsicum* chegou aos 17,2 milhões de toneladas em 1997 e nos últimos vinte anos essa produção praticamente dobrou. Em 2017, aproximadamente 36,1 milhões de toneladas de fruto *in natura* foram produzidas no mundo. Nesse período, a Ásia foi o principal continente produtor de pimenta, e em 2017 atingiu de cerca 24,3 milhões

de toneladas de fruto *in natura* e 388 mil toneladas de pimenta seca. Na Ásia, o principal país produtor de pimenta *in natura* é a China, com 17,8 milhões de toneladas em 2017, seguida pela Índia e Tailândia, que produziram respectivamente 2 milhões e 349 mil toneladas de pimenta seca.

No continente americano, em 2017, a produção de pimenta *in natura* atingiu cerca de 2 milhões de toneladas, das quais o principal país produtor foi o México (3,2 milhões de toneladas), seguido por Estados Unidos (962 mil toneladas) e Peru (153 mil toneladas) (FAOSTAT, 2019). No Brasil, a produção e comercialização de pimenta é realizada predominantemente pela agricultura familiar, o que dificulta a aquisição de dados precisos em relação à produtividade de pimentas do gênero *Capsicum*. Estima-se que sejam produzidas aproximadamente 75 mil toneladas de pimenta por ano (RIBEIRO *et al.*, 2018).

A pimenta é utilizada na elaboração de muitos pratos típicos de diferentes grupos étnicos e culturais, pode ser consumida *in natura* como salada e é componente de uma vasta quantidade de produtos industrializados. Na indústria de alimentos, a pimenta é ingrediente comum na elaboração de conservas, molhos, páprica, geleias, doces ou guloseimas e também pode ser encontrada como ingrediente secundário na elaboração de chocolates, bebidas, tempero completo, produtos cárneos, farofa e outros. É possível encontrar fármacos e cosméticos elaborados a partir de compostos presentes nas pimentas, como xampus e emplastos. E, inclusive o *spray* de pimenta utilizado para defesa pessoal ou como arma não letal pela polícia é elaborado a partir dos compostos presentes nos frutos. As aplicações não alimentícias derivam da presença de compostos capsaicinoides, encontrados em pimentas picantes do gênero *Capsicum*.

#### **4.1.1 Compostos capsaicinoides**

Os capsaicinoides são uma classe de compostos presentes exclusivamente em pimentas do gênero *Capsicum*. Esses compostos são responsáveis pela pungência percebida durante o consumo do fruto, causando a sensação de calor ao palato. Tal percepção é devido a afinidade dos capsaicinoides ao receptor de potencial transitório vaniloide subtipo 1 - TRPV1 (do inglês: *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 1*), que constitui um dentre cinco receptores sensíveis à

compostos com radicais vanilil (Urban *et al.*, 2011). Esses receptores de cátions atuam na modulação e percepção de estímulos de dor, mecânicos e térmicos. TRPV1 em presença de capsaicinoides é ativado, causando sensação de calor, queimação e ardência.

Os capsaicinoides são armazenados no interior do fruto, em “vesículas” presentes na placenta (Figura 1) (Stewart *et al.* 2005; Aza-González *et al.*, 2011), e quando essas estruturas são danificadas os capsaicinoides são liberados. Mais de 10 capsaicinoides já foram identificados em pimentas, dos quais capsaicina (*trans*-8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) e dihidrocapsaicina (8-metil-N-vanillilnonanamida) são os mais abundantes, compreendendo juntos em torno de 90% do total desses compostos (Nwokem *et al.*, 2010; Aranha *et al.*, 2017).

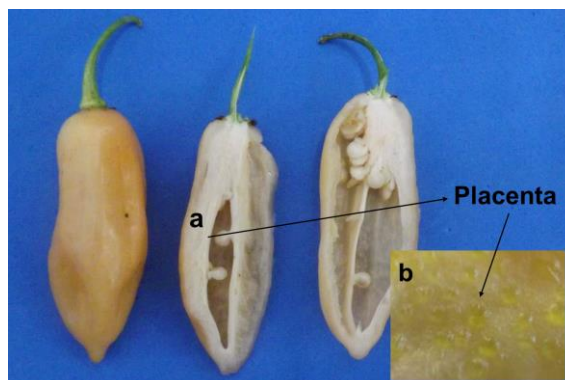


Figura 1. Corte transversal em pimenta (*Capsicum chinense*). a) Foto autoral, demonstração da placenta do fruto. b) Foto Aza-González *et al.* (2011), tecido dissecado de *Capsicum chinense* demonstrando as vesículas onde os capsaicinoides são armazenados.

Compostos capsaicinoides são alcaloides formados estruturalmente por um radical vanilil ligado a um ácido graxo por um grupamento amino na região central da molécula. Em 1800, estudiosos já demonstravam interesse pela biossíntese de capsaicinoides e em 1960 sua rota foi inicialmente definida (Bennett e Kirby, 1968; Leete e Loudon, 1968; Aza-González *et al.*, 2011). Estes compostos são sintetizados pela condensação da vanililamina, derivada dos fenilpropanoides, com ácidos graxos de cadeia ramificada, derivados dos aminoácidos valina ou leucina (Figura 2) (Stewart *et al.* 2005, Aza-González *et al.*, 2011). A formação de um capsaicinoide se dá a partir da ação das enzimas aminotransferase e capsaicina sintase (codificada pelo gene *PUN1* – *Acyl-transferase*) que catalisam a formação de vanililamina e capsaicina, respectivamente (Aza-González *et al.*, 2011).



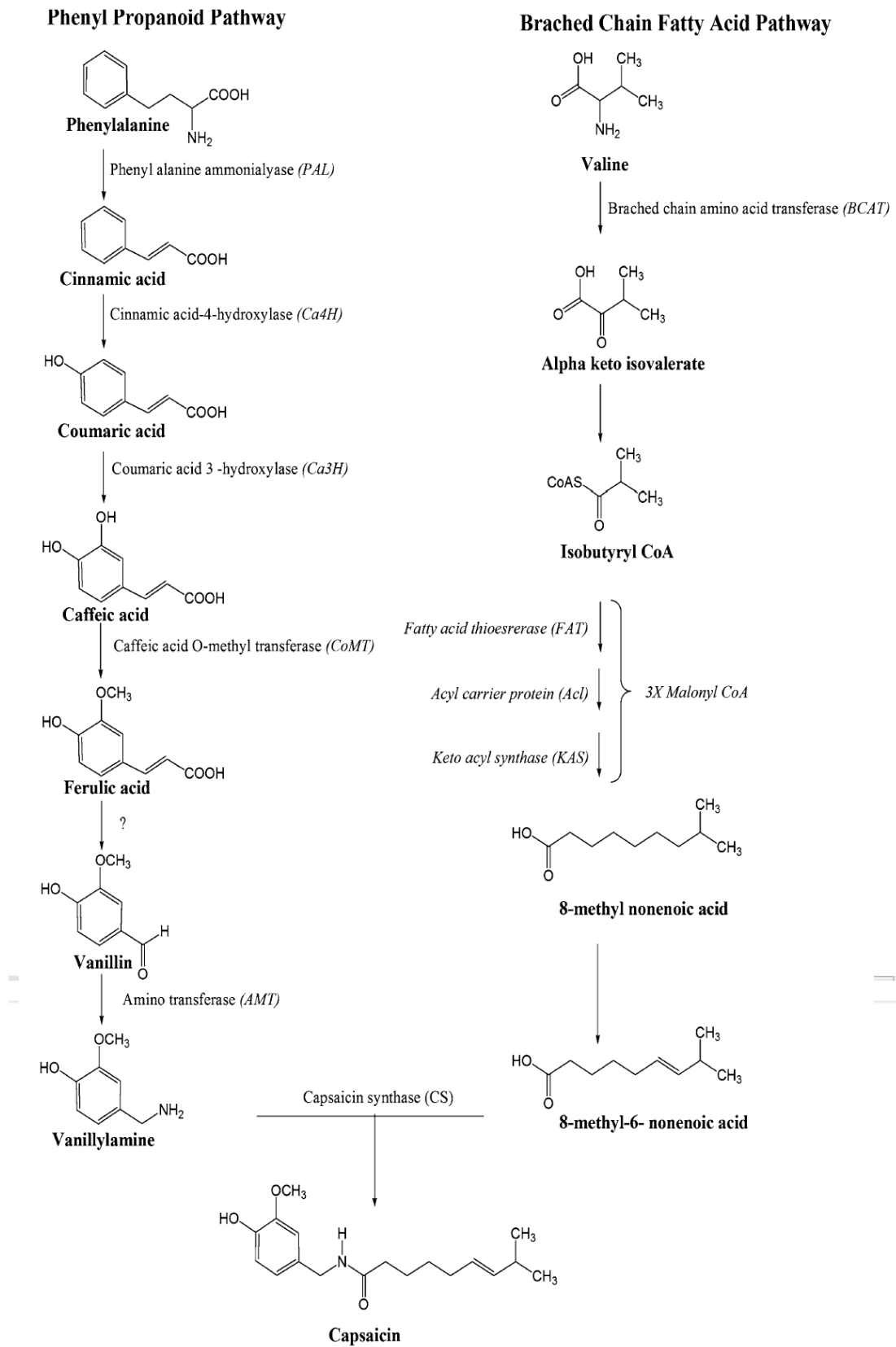


Figura 2. Representação das duas vias de biossíntese de capsaicinoides em pimenta *Capsicum* mostrando as principais enzimas e metabólitos intermediários. Figura adaptada: Aza-González *et al.* (2011).

Os capsaicinoides começam a ser formados aproximadamente a partir de 20 dias após a antese, tendo seu pico por volta dos 35-40 dias (Iwai *et al.* 1979; Castro-Concha *et al.*, 2016). A diversidade estrutural entre os compostos da classe dos capsaicinoides é resultado do ácido graxo disponível para a reação de síntese, que pode conter de 9 a 11 carbonos (Aza-Gonzalez *et al.*, 2011).

A determinação do grau de pungência foi definida inicialmente em 1912 por Wilbur Lincoln Scoville, que desenvolveu uma escala de medida baseada em diluições da pimenta em água. Para essa escala foi dado o nome de Teste Organoléptico de Scoville que buscava a menor diluição em que era possível a percepção da pungência (Scoville, 1912). Atualmente a determinação da pungência de pimentas tem sido por métodos instrumentais pela quantificação dos compostos capsaicinoides individualmente, principalmente capsaicina e dihidrocapsaicina (Stoica *et al.*, 2016).

O acúmulo de capsaicinoides nos frutos pode ser afetado por fatores genéticos, ambientais e por interações entre genótipo e ambiente (Sweat *et al.*, 2016). Diferentes estudos têm relatado que condições de estresses atuam como indutoras de acúmulo desses compostos afetando a pungência dos frutos (Phimchan, *et al.*, 2012; Phimchan, *et al.*, 2014; Kopta *et al.*, 2020).

## **4.2 Condições de estresse e fases de resposta em plantas**

Condições de estresse são alterações de caráter biótico ou abiótico capazes de desestabilizar o metabolismo das plantas. Quando extremas, essas condições acarretam no desequilíbrio celular e seu efeito pode ser prejudicial ao crescimento, desenvolvimento e ciclo da planta, podendo causar sua senescência (Lichtenthaler *et al.*, 1998; Cramer *et al.*, 2011). Estressores bióticos incluem organismos como vírus, bactérias, fungos, nematoides e insetos que se utilizam da planta para seu desenvolvimento. As condições estressoras abióticas são causadas por alterações de clima e solo adversas, desfavoráveis a manutenção da vida das plantas. Pode-se citar como fatores de estresse abiótico o excesso de radiação solar, temperaturas extremas (frio e calor), inundação ou seca, deficiência ou excesso de nutrientes, salinização ou presença de metais pesados no solo (Ashrafi-Dehkordi *et al.*, 2018).

Quando as condições hídricas, de temperatura, nutrição e radiação solar estão favoráveis ao desenvolvimento da planta, esta encontra-se em homeostase e o

metabolismo basal está ativo. Porém, se alguma dessas condições for alterada para níveis críticos, ocorre sinalização de alerta e a expressão de diversos genes é ativada. Para sobreviver sob condições de estresse, a planta percebe os sinais de alteração do seu ambiente e os transmite através de vias de transdução de sinal (Fujita *et al.*, 2006; Ashrafi-Dehkordi *et al.*, 2018). Essas respostas fisiológicas ao estresse protegem ou atenuam seus efeitos deletérios. Adicionalmente as plantas podem desenvolver mecanismos de resposta mais rápidos ou adaptar-se para sobreviver à nova condição ambiental, tornando-se tolerantes/resistentes a condição de estresse (Schwachtje *et al.*, 2019).

Durante uma condição estressora a planta passa por um processo de resposta que basicamente pode ser dividido em quatro fases, conhecidas como alarme, aclimação, manutenção e exaustão (Figura 3). Na fase de alarme, a planta que se encontrava em homeostase tem seus níveis fisiológicos alterados e pouca capacidade de tolerar a condição de estresse, o que pode causar danos severos e senescência. No entanto, se a planta conseguir suportar tais condições e ativar seu mecanismo de sinalização ela passa para a fase de aclimação. Durante a fase de aclimação ocorre a ativação de mecanismos de reparo, proteção e detoxificação celular. Nessa etapa diversas rotas de sinalização estão ativas e o metabolismo é alterado. Embora a planta não se encontre nas condições iniciais, ocorre um reajuste de homeostase intracelular (Lichtenthaler, 1998; Cabane e Hawkins, 2012).

Na fase de manutenção, a planta supera as etapas mais críticas e tem seu metabolismo estabilizado para tolerar a condição estressora por um período maior. Se essa condição de estresse for intensa ou prolongada a planta entra em exaustão. Nessa quarta etapa, a planta não tem mais a capacidade de reparar os danos fisiológicos causados e ocorre a morte celular e consequente senescência causada pelos danos crônicos. Embora a vitalidade da planta tenha sido reduzida significativamente, se o estresse for cessado antes da senescência, a planta entra em um estágio de recuperação, podendo estabelecer as condições normais de homeostase (Lichtenthaler, 1998; Cabane e Hawkins, 2012).

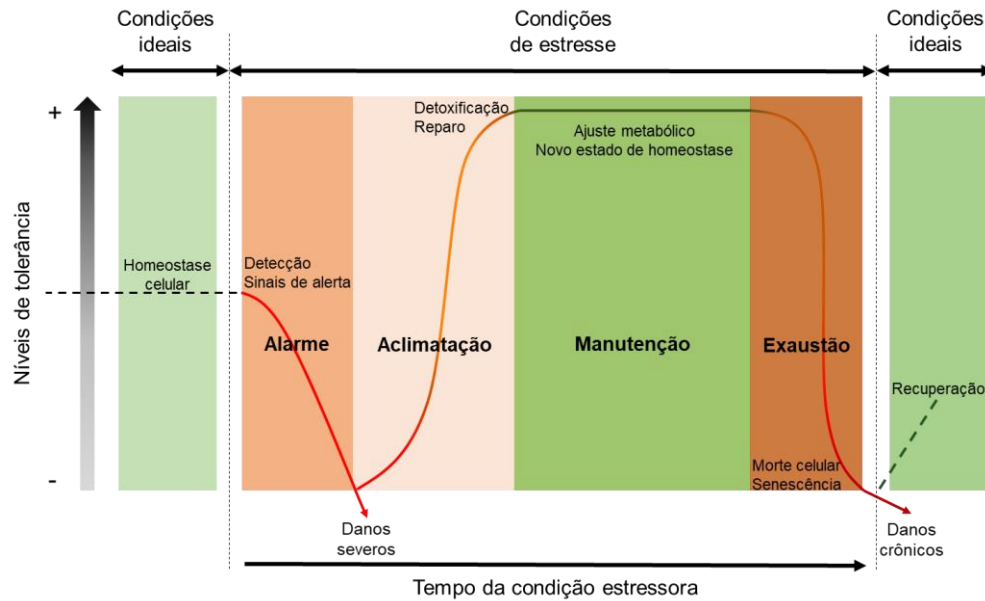


Figura 3. Fases de resposta das plantas em condições de estresses (alarme, aclimação, manutenção e exaustão). Figura adaptada: Cabane e Hawkins, (2012).

#### 4.2.1 Déficit hídrico em plantas

A expansão da agricultura, inclusive em áreas menos favoráveis ao cultivo, é muitas vezes acompanhada da escassez de recursos hídricos, o que torna o uso racionado de água na agricultura uma estratégia importante para acompanhar a crescente expansão agrícola (Grant *et al.*, 2010). No entanto, a redução de fornecimento de água pode causar uma condição de estresse nos vegetais. O déficit hídrico prolongado retarda o crescimento da parte aérea, reduz o acúmulo de biomassa e causa murcha permanente nas plantas. Isso ocorre em função do fechamento estomático, para evitar a transpiração e perda de água, reduzindo as trocas gasosas e atividade fotossintética (Oliveira *et al.*, 2002).

O estresse por déficit hídrico é uma condição causada quando o suprimento de água para as plantas é menor do que a taxa de evapotranspiração da cultura. As plantas de *Capsicum* tem necessidade de água em torno de 4 e 10mm por dia podendo consumir de 500 a 800mm de água durante todo o ciclo e até 1000mm de água para genótipos de ciclo longo (Embrapa, 2019). A água compõe aproximadamente 90% do tecido vegetal e desempenha importantes funções como mobilidade de moléculas no meio intracelular, participa da atividade de fotossíntese e formação de açúcares, corrobora na pressão de turgescência celular e auxilia na movimentação de nutrientes via xilema e floema (Pimenta, 2004).

Para tolerar a falta de água nos tecidos, as plantas fecham os estômatos, e pode haver o enrolamento das folhas, ocorrendo assim uma menor perda de água por transpiração (Inman-bamber e Smith, 2005; Bianchi *et al.*, 2016). Aprofundar as raízes rapidamente costuma ser uma estratégia das plantas na busca de escapar do déficit hídrico, mas de alto custo energético. Adicionalmente, ocorrem outras reações fisiológicas, como acúmulo de carboidratos e aminoácidos, ajuste osmótico, atividade aumentada de aquaporina, síntese de proteínas de choque térmico e produção de enzimas e compostos antioxidantes (Gaspar, 2011; Bianchi *et al.*, 2016).

Durante a deficiência hídrica ocorre diminuição do volume celular, o que aumenta as chances de interações de moléculas no citoplasma podendo causar reações enzimáticas indesejáveis, desnaturação de proteínas e fusão de membranas. O ajuste osmótico é um importante mecanismo de manutenção contra a desidratação e auxilia a planta em manter o turgor, facilitando a assimilação de gás carbônico. Para isso, ocorre aumento da concentração de íons ( $K^+$  e  $Cl^-$ ) e osmoprotetores (manitol, sorbitol, frutanos, trealose, sacarose e glicina-betaína, prolina, glutamato) que reduzem o potencial osmótico pela diminuição de energia de água livre (Jamaux *et al.*, 1997; Kavi Kishor *et al.*, 2005; Taiz e Zeiger, 2013).

#### **4.2.2 Sinalização molecular na resposta ao déficit hídrico em plantas**

Durante uma condição de estresse por déficit hídrico o metabolismo da planta pode ativar genes cujos produtos estão envolvidos na tolerância à essa condição. Isso proporciona aumento no tempo de vida para aguardar a chegada de condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento. Estudar os mecanismos moleculares envolvidos na resposta à seca é fundamental para a compreensão de como as plantas superam essa condição adversa (Hong e Kim, 2005).

Muitos genes que desempenham papel importante na tolerância de plantas em condições de estresse são ativados em resposta a fito-hormônios. O ácido abscísico (ABA), por exemplo, é um fito-hormônio que se acumula durante o estresse osmótico ocasionado pela seca. Esse composto proporciona o fechamento dos estômatos na planta e evita a transpiração excessiva e a perda de água. Em condições de estresse por déficit hídrico o ABA pode desempenhar alterações fisiológicas e morfológicas através da indução de fatores de transcrição que se ligam a elementos *cis* a montante

da região promotora de genes envolvidos na tolerância a esse estresse. Dessa maneira, o ABA regula a expressão de genes para condições de déficit hídrico, pela ativação de expressão de proteínas bZIP (do inglês: Basic domain/leucine zipper) que atuam sobre um elemento *cis* responsivo, denominado ABRE (do inglês: *abscisic acid - responsive element*) (Uno *et al.* 2000; Kim *et al.* 2001). Fatores de transcrição associados a ABRE controlam a expressão de genes de forma dependente do acúmulo de ABA (Figura 4). De maneira geral, os elementos *cis* atuam na regulação transcricional podendo auxiliar na ativação, supressão e superexpressão através da interação DNA/proteína em regiões a montante dos promotores desses genes.

Sob condição de seca, a resposta de sinalização da planta pode ocorrer através de via dependente ou também independente de ABA (Hong e Kim, 2005). Entre os genes induzidos em resposta a desidratação, por via independente de ABA, tem-se os fatores de resposta ao etileno – ERF/AP2 (do inglês: ethylene responsive factor/APETALA2) que se ligam em elementos responsivos ao etileno - ERE (do inglês: ethylene responsive element). Um estudo revelou 175 genes putativos para ERF/AP2 no genoma de *Capsicum annuum*, associando-os a funções no crescimento, desenvolvimento e respostas a diferentes condições estressoras nas plantas (Jin *et al.*, 2018). ERF/AP2 é uma superfamília que apresenta duas subdivisões, as famílias AP2 e ERF, na qual estão incluídas as subfamílias ERF e DREB e as famílias RAV e Soloist. Esses fatores de transcrição (AP2, ERF, RAV e Soloist) são classificadas de acordo com o número de domínios APETALA2. Por exemplo, a família AP2 apresenta dois domínios AP2 enquanto a família ERF possui apenas um único domínio (Rao *et al.*, 2005).

DREBs (do inglês: *dehydration-responsive element-binding*) são importantes fatores de transcrição de plantas por regularem a expressão de genes associados a condições de estresse por desidratação. Esses fatores de transcrição podem ser expressos de forma dependente de ABA, mas principalmente de maneira independente e desempenham um papel fundamental na tolerância de condições de estresse abiótico das plantas (Lata e Pasad, 2011). Proteínas DREBs interagem com um elemento *cis* DRE (do inglês: *dehydration responsive element*) presente na região promotora de vários genes responsáveis pelo controle de caracteres envolvidos na osmoproteção (Hussain *et al.*, 2011). Os fatores de transcrição DREB contêm um domínio de ligação ao DNA altamente conservado de ERF/AP2 que pode ser

observado em arroz, soja, milho, tomate e tabaco (Lata *et al.*, 2011). Foram descritos 145 genes da superfamília ERF/AP2 em *Arabidopsis*, dos quais 120 pertenciam a família ERF (com 65 na subfamília ERF e 56 na subfamília DREB), 17 pertenciam a família AP2, 6 a família RAV e 1 gene a família Soloist (Sakuma *et al.*, 2002).

Em *Arabidopsis thaliana*, a proteína DREB1A atua na ativação de outros fatores de transcrição ERF/AP2 em resposta a condições de seca (Kavar *et al.*, 2008). A superexpressão de fatores de transcrição DREB, conferiu maior tolerância em tomateiros sob frio e seca (Hsieh *et al.*, 2002a, Hsieh *et al.*, 2002b), em trigo sob condições de seca (Pellegrineschi *et al.*, 2004) e em arroz sob seca e alta salinidade (Oh *et al.*, 2005). Em uma cultivar pungente de pimenta (*Capsicum annuum*), um gene da subfamília DREB codificador da proteína Ca-DREBLP1 que se assemelha as proteínas do tipo DREB2 demonstrou rápida indução durante desidratação e sob condição de alta salinidade (Hong e Kim, 2005). Esses estudos têm mostrado que a expressão de DREBs muitas vezes não impede que as plantas apresentem murcha, enrolamento das folhas e redução da taxa fotossintética durante a desidratação, mas proporcionam acúmulo de açúcares, prolina e outros osmoprotetores que melhoram a recuperação na reidratação pós condição estressora.

A subfamília DREB apresenta diversas proteínas, envolvidas na proteção de plantas contra condições de estresse abióticos. Enquanto DREB1 sinaliza principalmente para via de transdução de sinal sob condições de estresse por frio, DREB2 está envolvida no controle da expressão de genes que atuam sob condições de estresse osmótico por desidratação (Liu *et al.*, 1998). Estudos com plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana* evidenciaram que a superexpressão de DREB1A melhora a tolerância em condições estressoras causadas tanto pelo frio quanto pela seca. Enquanto a superexpressão de DREB2A promove tolerância à desidratação e apenas uma leve tolerância ao congelamento (Maruyama *et al.*, 2009).

Além dos genes *DREBs*, fatores de transcrição como MYC (Myelocytomatosis Oncogene), MYB (Myeloblastosis Oncogene), NAC (NAM, ATAF, a CUC), também estão associados com as respostas a condições estressoras (Lata e Prasad, 2011) e podem desempenhar papéis importantes na alteração do metaboloma da planta como mecanismo de defesa. Um esquema básico de resposta ao estresse envolvendo esses genes pode ser observado na figura 4.

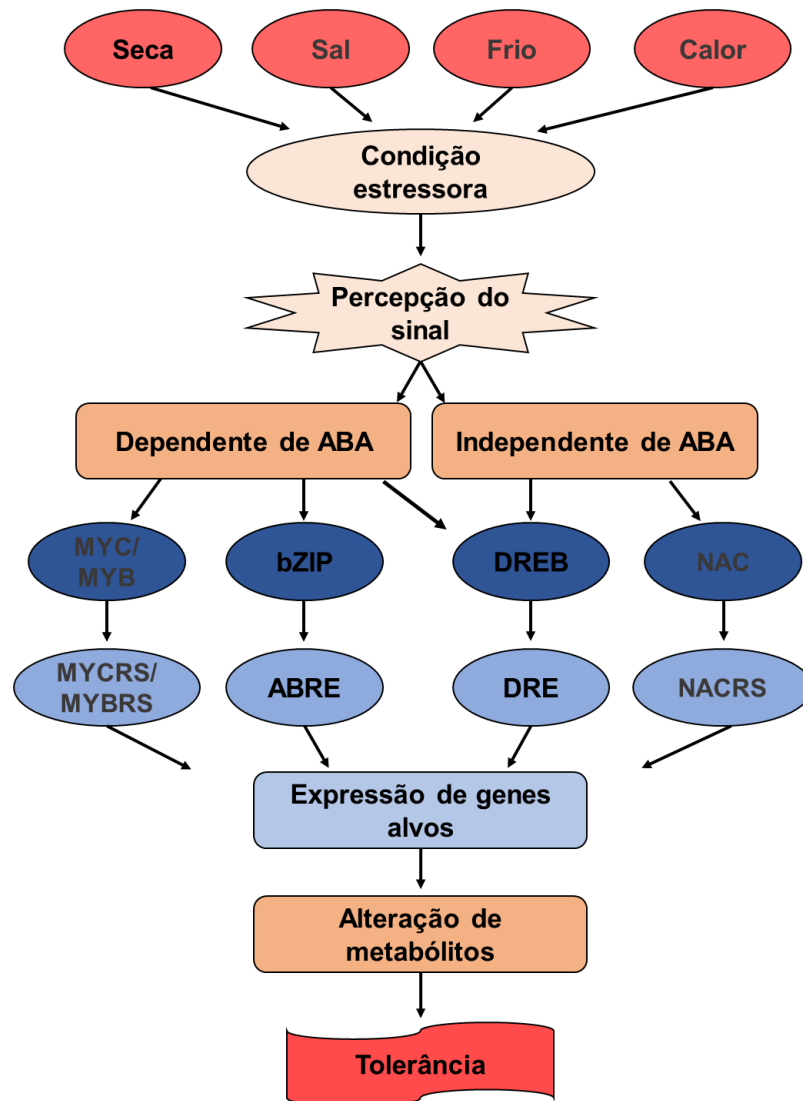


Figura 4. Representação esquemática da transdução do sinal por vias de sinalização dependente e independente do ácido abscísico (ABA) no metabolismo de plantas em condições estressoras. Figura adaptada: Lata e Prasad (2011).

#### 4.2.3 Metabólitos de plantas em condições de estresse

Normalmente as alterações ambientais são transitórias e após o término das condições estressoras as plantas podem se recuperar. Em resposta aos estresses ambientais, as taxas de reações enzimáticas são impulsionadas, o que afeta toda a rede metabólica das plantas. Mesmo estresses de curto prazo podem afetar o metabolismo e causar respostas duradouras no sistema metabólico da planta (Schwachtje *et al.*, 2019).

No momento em que a planta percebe o estresse ocorre a transdução do sinal e são ativados diversos genes, dando origem a muitas proteínas com atividade



enzimática que alteram toda a rede de metabólitos (Lichtenthaler, 1998; Gong *et al.*, 2013). Estudos têm demonstrado que muitos desses metabólitos ficam armazenados em níveis mais elevados quando comparados às condições anteriores ao estresse, resultando em uma resposta de defesa mais rápida. Estes metabólitos poderiam ser utilizados tanto no mecanismo de sinalização quanto como metabólitos de defesa das reações deletérias do estresse posterior (Schwachtje *et al.*, 2019).

Mesmo em condições normais, as espécies reativas de oxigênio (ROS) são formadas durante a fotossíntese, na respiração celular e na fotorrespiração. Condições de estresse elevam a formação de ROS e compostos pró-oxidantes que são nocivos para as células vegetais. A presença de tais moléculas pode causar danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídeos, danificando a estrutura celular. Para minimizar os danos, as plantas têm como sistema de defesa as enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutathione redutase, entre outras (Gong *et al.*, 2013). Essas enzimas tem a capacidade de neutralizar esses radicais e transformá-los em moléculas menos nocivas (Figura 5). Superóxido dismutase, por exemplo, tem a propriedade de sequestrar o radical aniônico superóxido e como produto de reação ocorre a formação de peróxido de hidrogênio e oxigênio. Catalase e peroxidase são enzimas que atuam na dismutação do peróxido de hidrogênio (Barbosa *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2013).

Adicionalmente, outros metabólitos também podem dar suporte a célula atuando na eliminação dessas espécies reativas, atenuando os danos oxidativos, como no caso do ácido ascórbico, glutathione, compostos fenólicos e carotenoides (Gong *et al.*, 2013). Ácido ascórbico e glutathione participam de um ciclo importante na eliminação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), com participação das enzimas ascorbato peroxidase e glutathione redutase. Carotenoides atuam como filtros de luz UV nos cloroplastos, reduzindo a intensidade energética da luz evitando danos celulares. Esses compostos têm seus níveis aumentados em presença de alguns estressores abióticos (Barbosa *et al.*, 2011; Gong *et al.*, 2013).

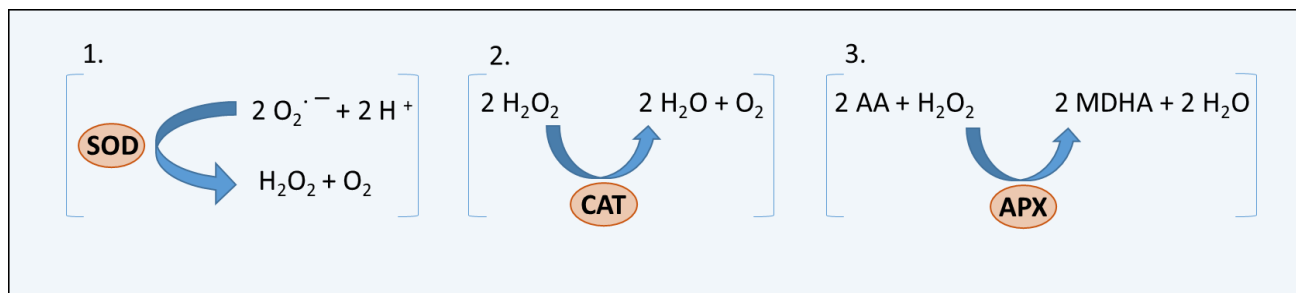


Figura 5. Ação das enzimas do sistema antioxidante em plantas. 1. Superóxido dismutase; 2. Catalase 3. Ascorbato peroxidase; <sup>AA</sup> ascorbato; <sup>MDHA</sup> monodehidroascorbato.

O acúmulo de compostos fenólicos foi investigado a partir da exposição de plantas de pimenta à radiação UV-B seguido por seca (Rodríguez-Calzada *et al.*, 2019). Os autores esperavam que o acúmulo dessa classe de compostos induzisse tolerância das plantas ao déficit hídrico. Os resultados demonstraram que ácido clorogênico e apigenina-8-C-hexosídeo tiveram seus níveis aumentados a partir da aplicação de UV-B e foram observados maiores teores de luteolina-6-C-pentosídeo-8-C-hexosídeo com a adicional condição de estresse por seca. O aumento desses compostos não induziu a tolerância das plantas à seca, mas a aplicação de UV-B propiciou a frutificação precoce, encurtando o ciclo das plantas de pimenta.

Outros compostos também podem ter atividade importante na manutenção da planta em condições de estresse. Glicose e sacarose são metabólitos bastante estudados como compostos de sinalização e desempenham importantes funções em situações de estresse osmótico. A frutose contribui para a defesa de tomateiros contra o patógeno *Botrytis cinerea* (Lecompte *et al.*, 2017). Glicose e frutose possuem vias reguladoras independentes, mas evidências tem demonstrado que interações entre essas moléculas sinalizam para condições de estresse das plantas, por alterações nos níveis hormonais e indução de precocidade em mudas (Cho e Yoo, 2011). Outro carboidrato que também apresenta propriedade osmoprotetora e atua na sinalização do estresse são os ciclitóis. O uso de mio-inositol exógeno em pimentas (*Capsicum annuum*) atenuou os efeitos deletérios do déficit hídrico. A aplicação desse composto proporcionou a redução dos níveis de peróxido de hidrogênio, da atividade das enzimas catalase e ascorbato peroxidase e do teor de prolina, quando comparado a plantas em condição de estresse não tratadas com mio-inositol (Yildizli *et al.*, 2018).

Aminoácidos e seus derivados também são compostos envolvidos na sinalização e tolerância ao estresse. Maiores teores de ácido  $\gamma$ -aminobutírico em

tabaco reduziram a virulência de *Agrobacterium tumefaciens* no mecanismo de comunicação celular (sensor de quórum) desse microrganismo (Chevrot *et al.*, 2006). A prolina é utilizada como metabólito marcador de diferentes condições de estresse como equilíbrio redox, osmoproteção, poder tampão e sinalização (Chevrot *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2013). Condições de déficit hídrico por 7 e 14 dias foram avaliadas com relação ao perfil de aminoácidos em folhas de pimentas (Florencio-Ortiz *et al.*, 2018). Os autores observaram um aumento significativo desses compostos, mas principalmente de prolina e hidroxiprolina cujas concentrações dobraram quando em condição de estresse. Várias funções são associadas a prolina tornando-a um composto fundamental no ajuste osmótico e na resistência da planta de pimenta contra condições de desidratação.

Alterações no teor de compostos em resposta a condições estressoras estão muitas vezes associadas com mudanças nas atividades das enzimas que participam de sua rota biossintética. Por exemplo, em pimentas (*Capsicum* spp.) tem-se estudado o acúmulo de capsaicinoides em resposta ao déficit hídrico (Ruiz-Lau *et al.*, 2011; Phimchan *et al.*, 2012; Phimchan *et al.*, 2014). Embora a enzima capsaicina sintase seja a última da rota de biossíntese e formadora da molécula de capsaicinoide, é a enzima fenilalanina amônia liase que apresenta a mesma performance do acúmulo de capsaicinoides em resposta ao estresse (Phimchan *et al.*, 2014). Isso demonstra que a formação de um composto pode ser regulada em diferentes momentos da rota de biossíntese.

Da mesma maneira, as respostas da planta a uma condição de estresse em relação ao acúmulo de metabólitos podem variar em função do genótipo. Em pimentas, por exemplo, compostos capsaicinoides tendem a acumular em restrição hídrica. Cultivares de alta pungência apresentaram menor flutuação nos teores de capsaicinoides durante essa condição e não apresentaram acúmulo sob seca, diferentemente de genótipos de média e baixa pungência, que tiveram o conteúdo de capsaicinoides aumentado (Phimchan *et al.*, 2014). Embora a interação genótipo-ambiente afete o acúmulo de capsaicinoides em pimentas, o genótipo é o principal fator contribuinte (Gurung *et al.*, 2011).

Metabólitos podem atuar na defesa a condições de estresse por combater diretamente suas consequências deletérias, como na eliminação de moléculas tóxicas e reativas, como coadjuvantes de enzimas de defesa, na redução dos riscos de novos

danos, ajuste osmótico na planta e contribuindo para o poder tampão celular. Os metabólitos também podem ser importantes sinalizadores de condições de estresse e atuarem na ativação de diversos genes importantes na defesa da planta (Schwachtje *et al.*, 2019).

## 5 Material e Métodos

### 5.1 Seleção dos genótipos e condição de déficit hídrico

Para o desenvolvimento do experimento, foram obtidas sementes do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS (Tabela 1). Foram selecionados três genótipos (genótipos) de *Capsicum baccatum* com níveis contrastantes de pungência: P232 (média pungência), P337 (baixa pungência) e P323 (sem pungência).

Tabela 1. Descrição de três genótipos de variedades locais de pimentas (*Capsicum baccatum*) do Banco Ativo de Germoplasma de *Capsicum* da Embrapa Clima Temperado

Genótipo	Nome Popular	Procedência	Posição do fruto	Cor do fruto maduro	Formato do fruto	Pungência
P232	Pimenta dedo de moça suave	Rio de Janeiro, RJ	Pendente	Vermelho escuro	Alongado	Picante médio
P337	Pimenta	Pelotas, RS	Pendente	Vermelho	Alongado	Picante baixo
P323	Pimenta cambuci	Arroio do Padre, RS	Pendente	Vermelho	Campanulada	Doce

Fonte: <http://alelobag.cenargen.embrapa.br/AleloConsultas/Home/index.do>

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, na sede da Embrapa Clima Temperado, Rodovia BR-392, km 78, 9º Distrito, Monte Bonito, Pelotas-RS. As sementes dos genótipos de *C. baccatum* foram semeadas em bandejas de poliestireno contendo substrato (Marca NutriJÁ). Após o surgimento de dois pares de folhas definitivas, as mudas foram transplantadas individualmente para vasos plásticos de 10 litros contendo a mistura de solo e substrato (proporção 1:1). Dez plantas de cada genótipo foram cultivadas em dois anos, nas safras 2016/17 e 2017/18, sendo cinco plantas de cada genótipo submetidas à restrição hídrica e cinco plantas mantidas sob condição ideal de fornecimento de água (tratamento controle).

A restrição hídrica foi aplicada quando os frutos apresentavam desenvolvimento completo, mas ainda se encontravam no estágio imaturo. As plantas em restrição hídrica eram irrigadas manualmente com 500mL de água em três dias

alternados na semana, por um período total de quatro semanas até os frutos atingirem a maturação comercial. Nas plantas do tratamento controle a irrigação era realizada diariamente com 500mL de água até os frutos atingirem a maturação comercial (Figura 6).



Figura 6. Genótipos de pimentas (*Capsicum baccatum*) em duas condições hídricas. a) Controle: 500mL de água diariamente. b) Déficit hídrico: 500mL de água em três dias alternados da semana.

## 5.2 Colheita e preparo amostral

A coleta dos frutos maduros (Figura 7) foi realizada no período da manhã, nos meses de abril e junho para os anos de cultivo de 2016/17 e 2017/18, respectivamente. As plantas em restrição hídrica não foram irrigadas no dia da coleta das amostras. As condições climáticas durante o período do tratamento podem ser observadas na Tabela 2. Foram selecionados apenas os frutos que não apresentavam lesões. Dois frutos por planta, totalizando dez frutos por tratamento, foram pesados e a cor da epiderme foi avaliada. Posteriormente, os frutos foram congelados a  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Tabela 2. Dados climáticos da Estação Agroclimatológica de Pelotas no período de aplicação de déficit hídrico nas plantas

Período de aplicação de déficit hídrico – Safral							Período de aplicação de déficit hídrico – Safral II						
Mês	Dia	TM <sup>1</sup>	AM <sup>2</sup>	UR <sup>3</sup>	IS <sup>4</sup>	RS <sup>5</sup>	Mês	Dia	TM <sup>1</sup>	AM <sup>2</sup>	UR <sup>3</sup>	IS <sup>4</sup>	RS <sup>5</sup>
Março 2017	3	26,0	9,5	89,5	3,0	263	Maio 2018	9	20,3	4,7	93,8	0,0	96
	4	23,1	2,7	95,3	0,0	162		10	21,7	7,4	90,0	1,7	135
	5	22,3	7,4	84,0	2,6	218		11	19,8	6,0	85,3	6,7	252
	6	22,0	11,1	88,3	7,9	371		12	15,4	8,6	85,3	10,0	326
	7	22,6	11,2	81,3	11,5	540		13	13,9	14,4	86,5	9,0	301
	8	25,0	10,1	84,0	8,7	421		14	14,8	14,8	87,3	5,8	225
	9	23,3	7,7	84,8	0,0	157		15	17,2	8,4	91,3	0,0	91
	10	21,3	8,2	81,5	7,4	398		16	12,8	8,4	80,3	9,1	300
	11	20,6	16,0	73,3	10,0	480		17	12,5	12,4	84,8	6,0	227
	12	19,1	8,3	77,0	6,1	352		18	14,0	5,2	91,5	0,9	110
	13	18,2	11,4	79,3	11,4	522		19	13,6	4,2	86,5	0,4	98
	14	18,9	15,5	78,8	11,3	515		20	13,3	7,3	93,3	4,8	195
	15	23,4	14,7	82,3	8,5	426		21	13,3	8,5	84,0	8,4	227
	16	19,7	7,0	90,8	0,6	169		22	12,9	9,7	76,0	9,2	290
	17	15,8	10,7	79,3	11,1	503		23	10,9	11,8	76,8	10,0	307
	18	17,1	13,4	85,5	7,8	395		24	10,8	15,0	83,3	9,4	292
	19	19,2	10,8	82,0	6,7	359		25	10,3	16,1	82,5	9,8	299
	20	19,0	10,7	85,8	8,9	424		26	12,5	15,9	87,8	8,1	260
	21	20,4	12,2	89,5	8,7	417		27	16,6	15,0	89,0	7,9	255
	22	22,6	9,5	85,8	8,4	407		28	19,6	16,0	79,5	9,2	283
	23	22,7	5,6	90,3	2,7	226		29	17,7	15,5	80,3	9,1	279
	24	21,4	10,3	87,8	9,2	426		30	18,8	15,5	78,5	6,4	220
	25	21,7	9,8	86,0	9,2	456		31	17,3	2,4	95,8	0,0	82
	26	22,9	5,6	84,5	7,2	360	Junho 2018	1	15,6	2,8	96,3	8,7	0
	27	22,5	5,1	88,8	8,1	384		2	12,3	5,6	77,0	8,6	263
	28	21,7	7,8	83,3	7,3	357		3	12,0	10,2	87,0	7,1	231
	29	22,0	8,6	81,0	9,9	435		4	14,1	9,6	86,8	6,3	212
	30	21,0	6,9	80,3	9,4	417		5	13,1	4,2	97,3	0,0	81
	31	21,0	10,7	79,5	10,0	431		6	9,4	7,0	81,0	7,1	229
Valor médio		21,3	9,6	84,1		379			14,7	9,7	86,0		213
Máxima		33,4*	16,0	95,3		540			29,8*	16,1	97,3		326
Mínima		10,6*	2,7	73,3		157			3,0*	2,4	76,0		0
Total					213,6							179,7	

<sup>1</sup> Temperatura média diária (°C); <sup>2</sup> Amplitude (°C); <sup>3</sup> Umidade relativa (%); <sup>4</sup> Insolação (horas e décimos); <sup>5</sup> Radiação solar (cal cm<sup>-2</sup> dia<sup>-1</sup>); \* baseado nos valores individuais de temperatura máxima e mínima. Dados disponíveis online no site do Laboratório de Agrometeorologia Embrapa/UFPel: <http://agromet.cpact.embrapa.br/>

Para as análises molecular e de atividade enzimática, os frutos coletados foram particionados, acondicionados em frascos estéreis ainda na casa de vegetação e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente o material vegetal foi transportado em caixas de isopor contendo nitrogênio líquido até o laboratório onde foram macerados em moinho de bola (Marconi, MA350) com nitrogênio líquido e acondicionados em ultra freezers a -80°C, até o momento da análise.



Figura 7. Pimentas (*Capsicum baccatum*) pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Foto: Henrique Padilha.

As análises de caracterização do estágio de maturação dos frutos (massa, cor, pH, acidez e sólidos solúveis) e de sua condição fisiológica por indicadores de estresse (potencial osmótico, prolina e glicina-betaína) foram realizadas nos frutos *in natura*. As análises dos marcadores de estresse também foram realizadas nas folhas.

Para as análises de fitoquímicos e de atividade antioxidante os frutos foram liofilizados (Liobras, L101) e macerados em moinho de bola (Marconi, MA350) com auxílio de nitrogênio líquido. As análises metabólicas, bioquímicas e moleculares em folhas e frutos de pimenta foram realizadas na Universidade Federal de Pelotas junto ao Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Departamento de Botânica (área de fisiologia vegetal) e Centro de Genômica e Fitomelhoramento.

### 5.3 Parâmetros de maturação e rendimento dos frutos

A caracterização dos frutos controle e daqueles sob condição de estresse ocasionado por déficit hídrico foi determinada a partir das avaliações de massa, cor da epiderme, potencial hidrogeniônico (pH), acidez total e teor de sólidos solúveis. A massa média foi determinada a partir do peso médio de dez frutos utilizando balança de precisão (Shimadzu, ATY224). Os resultados foram expressos em gramas. A coloração dos frutos foi determinada utilizando colorímetro (Minolta Chromometer, CR 300) no padrão CIE- $L^*a^*b^*$ . Valores  $L^*$  representam luminosidade;  $a^*$  definem a escala verde/vermelho e  $b^*$  a escala amarelo/azul. Para a medida de cor três leituras foram realizadas na epiderme de dez frutos. O ângulo Hue ( $^\circ\text{Hue}$ ) foi calculado usando a fórmula  $^\circ\text{Hue} = \tan^{-1} (b^*/a^*)$ . Para as análises de pH e acidez total, 2g de amostra fresca de pimentas maceradas em moinho de bolas (Marconi, MA 350) foram adicionadas de 40mL de água ultra-pura e homogeneizadas. O pH foi determinado utilizando pHmetro digital (Kasvi, Benchtop pH meter). Subsequentemente, as



amostras foram tituladas com NaOH 0,1mol/L até pH 8,1. Os resultados de acidez total foram expressos em mg equivalente de ácido cítrico 100g<sup>-1</sup> em base úmida (Instituto Adolfo Lutz, 2008). Para a medida do teor de sólidos solúveis, utilizou-se refratômetro digital (Atago, PR-32α) com limites de 0 a 32% e os resultados foram expressos em °Brix.

## 5.4 Análises moleculares

Foi feita a caracterização do perfil transcricional dos genes *Acyl-transferase* (*PUN1*), *Dehydration-responsive element-binding protein 1A-like* (*DREB1A*) e *Ethylene-responsive transcription factor 5-like* (*ERF5*). Como genes normalizadores foram utilizados *Actin-7-like* (*ACT*), *E3 ubiquitin-protein ligase* (*UBQ*), *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*).

### 5.4.1 Extração do Ácido Ribonucleico total

As extrações de RNA (ácido ribonucleico; do inglês: *ribonucleic acid*) foram realizadas em duplicata biológica, nos frutos dos genótipos dos tratamentos controle e déficit hídrico nos dois anos de cultivo pelo método proposto por Zeng e Yang (2002). Cada replicata biológica foi representada por um *pool* de frutos de cinco plantas (2 frutos por planta), totalizando dez frutos. Aproximadamente 100mg de cada amostra previamente macerada foram transferidos para tubos de centrífuga de 2mL e adicionados de 750μL de tampão de extração (brometo de cetiltrimetilamonio, polivinilpirrolidona, TRIS-HCL 1M [pH 8,0], ácido etilenodiaminotetracético 0,5M [pH 8,0], cloreto de sódio 5M e β-mercaptoetanol) pré-aquecido (65°C/10 minutos). A mistura foi homogeneizada por inversão e incubada por 10 minutos à 65°C em termomisturador (Eppendorf, Thermomixer comfort). Após, 750μL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foram adicionados, as amostras foram homogeneizadas e imediatamente centrifugadas a 8000×g durante 15 minutos a 4°C (Eppendorf, 5810R).

O sobrenadante coletado foi transferido para um tubo de 2mL ao qual foi novamente adicionado 750μL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), homogeneizado e centrifugado nas mesmas condições. Posteriormente o sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5mL e adicionado de 0,6 volumes de isopropanol gelado (4°C) e 0,1

volumes de acetato de sódio 3M pH 5,5. As amostras foram homogeneizadas por inversão e armazenadas a -80°C por 25 minutos e em seguida centrifugadas a 12500 × g durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, todo o líquido foi descartado e o *pellet* foi solubilizado em 50µL de água (Invitrogen™) e adicionou-se 0,25 volumes de solução de cloreto de lítio 10 M, o qual permaneceu em *overnight* a 4°C.

No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas a 12500 × g por 60 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado por 3 vezes com 500µL de etanol 75% gelado (4°C). O RNA precipitado permaneceu em temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos e posteriormente foi ressuspendido em 30µL de água (Invitrogen™) e armazenado a -80°C. A concentração e pureza do RNA total extraído foram mensuradas através de espectrofotômetro UV-Vis Nanovue (NanoVue Plus, GE Healthcare Life Sciences) pela análise da razão das absorbâncias nos comprimentos de onda 260nm/280nm e 260nm/230nm e a integridade pela eletroforese em gel de agarose 1%.

Para degradação de DNA (ácido desoxirribonucleico; do inglês: *deoxyribonucleic acid*) contaminante, as amostras foram tratadas com DNase I (Invitrogen™). Em tubo de 200µL, livre de RNases, contendo 2µL de DNase I e 2µL de tampão 10X [200mM Tris-HCl (pH 8,4), 20mM MgCl<sub>2</sub>, 500mM KCl], adicionou-se o volume previamente calculado de RNA total para concentração de 1 µg e a reação foi completada para um volume total de 10µL com H<sub>2</sub>O. As amostras foram transferidas para termociclador (Mj Research, PTC-100) a 25°C por 15 minutos. Posteriormente, para inativação da DNase I adicionou-se 1,5µL de EDTA [25mM; pH 8,0], submetendo-se a 65°C por 10 minutos em termociclador. Para confirmação da eliminação do DNA contaminante, uma reação de PCR foi conduzida em termociclador ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems®), utilizando iniciadores correspondentes ao gene constitutivo GAPDH. Apenas as amostras que não apresentaram amplificação foram utilizadas para síntese de DNA complementar (cDNA).

#### 5.4.2 Síntese do DNA complementar

Para a síntese do cDNA, o RNA total de cada genótipo, anteriormente digerido com DNase I, foi transcrito reversamente utilizando o kit *SuperScript™III First-Strand*

*System for RT-PCR* (Invitrogen™), de acordo com as indicações do fabricante. Adicionou-se 1 µL de Oligo dT (50 µM) e 1 µL de dNTP Mix (10 mM) e a reação foi acondicionada em termociclador a 65°C por 5 minutos, seguido de 1 minuto a 0°C. Em seguida, adicionou-se 2 µL de RT Buffer 10x, 4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µL de DTT [(1,4-Dithiothreitol) (0,1 M)], 0,5 µL de RNase OUT™ (40 U µL<sup>-1</sup>) e 0,5 µL de SuperScript™ III (200 U µL<sup>-1</sup>), e as amostras foram transferidas para o termociclador a 50°C por 50 minutos, seguido de mais 5 minutos a 85°C. Por fim, adicionou-se 0,5 µL de RNase H (2 U µL<sup>-1</sup>) e a reação permaneceu por 20 minutos a 37°C no termociclador, completando a reação de síntese de cDNA. A qualidade dos cDNAs foi avaliada através uma reação de PCR em termociclador ABI PRISM 7500 Fast (Applied Biosystems®) utilizando iniciadores correspondentes ao gene constitutivo da GAPDH.

#### 5.4.3 Desenho de iniciadores para expressão gênica

O desenho dos iniciadores (ou *primers*; do inglês) para análise de RT-qPCR (do inglês: *reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction*) foi realizado através do programa online *Primer 3 Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) conforme os seguintes parâmetros: formação de um *amplicon* de tamanho entre 50 e 150 pb, conteúdo de CG entre 40% e 60% e temperatura de anelamento variando entre 60 e 65°C, de acordo com as recomendações da Applied Biosystems®.

Os iniciadores foram desenhados para três grupos de genes: normalizadores ou constitutivos; responsivos a estresse; e, de biossíntese de capsaicínoides (Tabela 3). Os genes utilizados para o desenho dos iniciadores foram baseados no genoma de *C. annuum* a partir de sequências depositadas nas bases de dados online *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e *Sol Genomics Network* (SGN, <https://solgenomics.net/>). Para normalização dos dados foram selecionados três genes constitutivos que codificam as proteínas actina, ubiquitina ligase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, conforme proposto por Wan et al. (2011).

Tabela 3. Características dos genes e iniciadores utilizados nas análises de expressão dos genes em RT-qPCR

Descrição do gene	Senso (5' - 3')	Anti-senso (3' - 5')	Amplicon (pb)	Identificação do gene*
<i>Actin-7-like (ACT)</i>	TGCTGATCGTATGAGCAAGG	TGCTAAGTGATGCGAGGATG	125	CA12g08730 <sup>a</sup> ; LOC107850541 <sup>b</sup>
<i>E3 ubiquitin-protein ligase (UBQ)</i>	CCTGAGCTTGCTCTTCAACC	AGCCATTTGCTAATGCATCC	128	CA10g18620 <sup>a</sup> ; LOC107843749 <sup>b</sup>
<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)</i>	CCCATGGAGTTTTTCAGAGGA	TATCTGCAGGGTCCCTTTTG	102	CA10g00750 <sup>a</sup> ; LOC107845282 <sup>b</sup>
<i>Acyl-transferase/ Capsaicin synthase (PUN1)</i>	AATGTGCAACAAAGGCATCA	AGATTTCCAATGGCATTTCG	109	CA02g19260 <sup>a</sup> ; LOC107859694 <sup>b</sup>
<i>Dehydration-responsive element-binding protein 1A-like (DREB1A)</i>	AGGCAAATGGGTTTGTGAAG	CCACGTCATGAGCTCTAGCA	101	CA03g16520 <sup>a</sup> ; LOC107863343 <sup>b</sup>
<i>Ethylene-responsive transcription factor 5-like (ERF5)</i>	CACTCGGGTTTGGTTAGGAA	CACTCGGGTTTGGTTAGGAA	76	CA03g13530 <sup>a</sup> ; LOC107851226 <sup>b</sup>

\* código para acessar a sequência online (<sup>a</sup> SGN, <https://solgenomics.net/>; <sup>b</sup> NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### 5.4.4 Validação dos iniciadores para análise de expressão gênica

Para a validação dos iniciadores dos genes alvos ou constitutivos, a curva de dissociação e a reta de eficiência de amplificação foi gerada a partir de um mix de cDNAs contendo todas as amostras, que foi diluído em cinco concentrações (1:1; 1:5; 1:25; 1:125; 1:625). A verificação da especificidade dos iniciadores foi feita a partir da análise das curvas de dissociação. Foram utilizados apenas aqueles iniciadores que apresentaram pico único na curva de dissociação. A eficiência foi calculada através de um gráfico de regressão linear do valor Ct (ciclo limiar, do inglês: *threshold cycle*) em comparação ao log das diluições de cDNA, apresentando o valor de *slope*. O *slope* é a inclinação da curva padrão gerada pelos dados [log da concentração das amostras × Ct]. O valor de Ct é dado quando a curva de amplificação (reação *vs* fluorescência) atinge um ângulo de 45° entre as coordenadas x e y, estabelecendo o limiar. Esse limiar é importante tanto para avaliar eficiência dos iniciadores, quanto na quantificação da diferença de transcritos entre as amostras. Para avaliar a eficiência dos iniciadores na RT-qPCR utilizou-se a fórmula eficiência (E) =  $10^{(-1/\text{slope})}$ . Foram utilizados iniciadores cujos valores de eficiência estavam próximos a 100% ( $\pm 10\%$ ). Adicionalmente, o valor de R<sup>2</sup> (coeficiente de determinação) foi utilizado para avaliar numericamente a variação do sinal analítico (y) explicado pelo aumento do número de ciclos (x).

#### 5.4.5 Análise de RT-qPCR para quantificação relativa de transcritos

A análise de RT-qPCR foi realizada de acordo com o manual MIQE (Bustin *et al.* 2009). Para quantificação em tempo real foi utilizado 3µL de solução preparada de SYBR<sup>TM</sup> Green I nucleic acid gel stain (10.000x in DMSO, invitrogen®), 2µL de tampão (10x pcr Rxn buffer), 1,5µL MgCl<sub>2</sub> (50mM), 1µL de cDNA (diluído 1:5, selecionada com base nos resultados das análises de validação), 0,5µL de cada iniciador (10µM), 0,25µL de ROX reference Dye, 0,2µL de dNTP (10µM), 0,05µL de Platinum taq DNA polymerase (5u/µL) e 11µL água ultra-pura (invitrogen<sup>TM</sup>) para completar o volume final de reação de 20µL. As amostras foram acondicionadas em placas (96 well optic plates - Applied Biosystems®) e cobertas com adesivo óptico (Optic Adhesives – Applied Biosystems®). As reações foram realizadas em termociclador ABI PRISM

7500 Fast (Applied Biosystems®). Foram utilizadas duas repetições biológicas e três repetições técnicas.

As condições de ciclagem utilizadas para amplificação foram: desnaturação inicial (95°C, durante 10 minutos); 40 ciclos (desnaturação 95°C, durante 15 segundos; anelamento, que variou conforme o primer de 60°C a 62°C, durante 1 minuto; extensão 72°C, durante 1 minuto), ocorrendo a leitura da fluorescência neste último passo. A quantificação relativa de cada gene foi feita utilizando o método do Ct comparativo, de acordo com o método  $\Delta\Delta C_t$  (Livak e Schmittgen, 2001), tendo os dados de expressão do gene alvo normalizados em relação a expressão de gene de referência (normalizadores/constitutivos).

Para normalização foram testados três genes *ACT*, *UBQ* e *GAPDH*. Os dados de expressão dos genes normalizadores foram submetidos à análise de estabilidade no software *DataAssist™ v3.0 Software* (Applied biosystems) verificando que os valores de *score* estavam abaixo de 1,0. O tratamento controle de cada genótipo foi utilizado como amostra calibradora.

#### **5.4.6 Identificação de elementos regulatórios de ação *cis***

Os elementos regulatórios de ação *cis* foram identificados no promotor predito de mil pares de bases a montante do códon de iniciação ATG dos genes *PUN1*, *DREB1A* e *ERF5*. Os promotores preditos foram identificados a partir da base de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponível online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e a constituição de elementos regulatórios de ação *cis* foi identificada na plataforma *New Place*, disponível online: <https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>.

### **5.5 Determinação de marcadores de estresse nas folhas e frutos de pimenta**

#### **5.5.1 Teor de glicina-betaína**

O teor de glicina-betaína foi determinado por método proposto por Grieve e Grantthan (1983), com adaptações. Cinquenta miligramas de amostra fresca (folha ou fruto) foram adicionados de 2mL de água deionizada e os extratos foram mantidos

sob agitação por 24 horas a 25°C. Os extratos foram filtrados e armazenados a -20°C por 24 horas. Após descongelamento total, 250µL do filtrado foi misturado com 250µL de ácido sulfúrico (2 N), permanecendo por 1 hora em água gelada (aproximadamente 4°C). Posteriormente, foram acrescentados 200µL de lugol e a mistura foi acondicionada a 4°C por 16 horas. Os extratos foram centrifugados a 12.000 × g por 15 minutos a 0°C, o sobrenadante foi coletado e homogeneizado com 900µL de 1,2-dicloroetano. Após 2 horas e 30 minutos, com agitação em vortex a cada 30 minutos. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 365nm. A curva padrão foi preparada com na faixa de 50-200µg mL<sup>-1</sup> e o resultados expresso em µg de glicina-betaína g<sup>-1</sup> em base úmida.

### 5.5.2 Teor de prolina

Para a determinação do teor de prolina nas folhas e frutos de pimenta, foram pesados 200mg de amostra fresca, e 2mL de ácido sulfosalicílico (3%) foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos em vortex e centrifugadas a 13.000 × g por 10 minutos a 25°C. Um mililitro do sobrenadante coletado foi transferido para tubos de ensaio com tampa e adicionados de 2mL de ácido de ninhidrina, 2mL de ácido acético glacial e 2mL de água destilada. As amostras permaneceram em banho-maria a 100°C por 1 hora, e em seguida, transferidas para banho de gelo. Após esse procedimento, foram adicionados 4mL de tolueno e homogeneizou-se em vortex por 10 segundos e a fase superior foi coletada. Realizou-se leitura em espectrofotômetro (Jenway, 6705) em comprimento de onda de 520nm (Bates *et al.*, 1973). Para a quantificação, uma curva padrão foi preparada com prolina na faixa de 0,02-0,1mmol mL<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em mmol prolina g<sup>-1</sup> base úmida.

### 5.5.3 Potencial osmótico

O potencial osmótico foi determinado com auxílio de osmômetro de pressão de vapor (VAPRO, 5600) conforme especificações do fabricante. Aproximadamente 500mg de frutos ou folhas de pimenta frescos, foram macerados em tubos do tipo falcon (15mL) com auxílio de bastão de vidro para extração da seiva. Posteriormente

as amostras foram centrifugadas (Eppendorf, 5430) a  $3000 \times g$ , a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos e o sobrenadante ( $600\mu\text{L}$ ) foi coletado e transferido para microtubos de centrifuga para ser novamente centrifugado ( $11000 \times g$  por 30 segundos a  $4^{\circ}\text{C}$ ) retirando todo o residual sólido. Uma alíquota de  $10\mu\text{L}$  foi utilizada para realização das leituras em osmômetro, totalizando quatro repetições por amostra. Na conversão dos valores de  $\text{mmol kg}^{-1}$  em potencial osmótico ( $\Psi_s$ ), utilizou-se a equação de Van't Hoff em que  $\Psi_s = -C \times 2,58 \times 10^{-3}$ , onde C é o valor de osmolalidade.

## **5.6 Avaliação da atividade de enzimas do sistema antioxidante e quantificação de metabólitos indicadores de estresse oxidativo em frutos de pimenta**

### **5.6.1 Determinação do teor de proteínas totais**

A quantificação de proteínas nos extratos de pimenta foi realizada conforme metodologia descrita por Bradford (1976). As leituras de absorbância foram efetuadas em espectrofotômetro a  $595\text{nm}$  e comparadas com a curva padrão de albumina de soro bovino ( $20\text{-}100 \text{ mg mL}^{-1}$ ), sendo o teor proteico da amostra expresso em  $\mu\text{g}$  proteína  $\text{mg}^{-1}$  em base úmida. O teor proteico foi utilizado exclusivamente para quantificação da atividade das enzimas do sistema antioxidante (SOD, CAT e APX).

### **5.6.2 Atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase**

Para extração das enzimas,  $200\text{mg}$  de amostras frescas foram homogeneizadas com  $2\text{mL}$  de tampão fosfato de potássio  $100\text{mM}$  ( $\text{pH } 7,5$ ), contendo ácido etileno diamino tetracético  $1\text{mM}$ , ditioneitol  $3\text{mM}$  e  $4\%$  (m/v) polivinilpolipirrolidona segundo proposto por Azevedo *et al.* (1998). Posteriormente, a mistura foi centrifugada a  $12.100 \times g$  por 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  em centrifuga (Eppendorf, 5430) e o sobrenadante coletado foi utilizado para determinar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotoredução do azul de dinitrotetrazólio. O meio de reação foi formado por  $1.000\mu\text{L}$  de fosfato de potássio  $100\text{mM}$  ( $\text{pH } 7,8$ ),  $400\mu\text{L}$  de metionina  $70\text{mM}$ ,  $20\mu\text{L}$  de EDTA  $10\mu\text{M}$ ,  $310\mu\text{L}$



de água, 150µL de NBT 1mM, 100µL de extrato e 20µL de riboflavina 0,2mM e procedeu-se leitura em espectrofotômetro a 560nm (Giannopolitis e Ries, 1977). A atividade da CAT foi determinada por espectrofotometria através da degradação do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 240nm por 3 minutos como descrito por Kraus *et al.* (1995) com modificações propostas por Azevedo *et al.* (1998). O meio de reação de CAT consistiu de 1.000µL de fosfato de potássio 200mM (pH 7.0), 800µL de água, 100µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 250mM e 100µL de extrato. A atividade da APX foi determinada segundo método proposto por Nakano e Asada (1981), por meio da avaliação da taxa de oxidação do ácido ascórbico a 290nm. O meio de reação para determinação de APX foi composto por 1.000µL de fosfato de potássio 200mM (pH 7.0), 700µL de água, 100µL de ácido ascórbico 10mM, 100µL de peróxido de hidrogênio 2mM e 100µL de extrato. Para todas as análises as medidas das absorbâncias foram avaliadas em espectrofotômetro (Jenway, 6705). Os resultados foram expressos em µmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> proteína em base úmida.

### 5.6.3 Peroxidação lipídica e conteúdo de peróxido de hidrogênio

A peroxidação de lipídios foi avaliada através da determinação do teor de metabólitos reativos ao ácido 2-tiobarbitúrico, principalmente o malondialdeído (MDA), segundo proposto por Cakmak e Host (1991). Para extração, 200mg de frutos foram macerados em 1,5mL de uma solução de ácido tricloroacético a 0,1%. A quantificação do teor de MDA nas amostras foi feita em espectrofotômetro (Jenway, 6705) nos comprimentos de onda 535nm e 600nm. Os resultados de peroxidação lipídica foram expressos em nmol MDA g<sup>-1</sup> em base úmida.

A determinação do teor de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) seguiu a metodologia proposta por Velikova *et al.* (2000). A partir do mesmo extrato preparado para a peroxidação lipídica, a reação ocorreu em meio de tampão fosfato de potássio 10mM (pH 7,0) e iodeto de potássio 1M. A determinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi feita em espectrofotômetro (Jenway, 6705) no comprimento de onda 390nm e os valores foram expressos em µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> em base úmida. Para a curva de calibração uma concentração de peróxido de hidrogênio de 2mM foi preparada e então utilizou-se alíquotas com diluições de 0-100uL mL<sup>-1</sup>.

## **5.7 Atividade antioxidante e teor de metabólitos totais dos frutos**

### **5.7.1 Potencial antioxidante**

O potencial antioxidante dos frutos de pimenta foi determinado pelo método de captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (Brand-Williams, Cuvelier e Berset, 1995) e do radical ABTS (2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (Rufino *et al.*, 2007).

Para reação frente ao radical DPPH, 100µL do extrato, o mesmo usado para avaliação de compostos fenólicos (descrito no item 5.7.3), foi adicionado à 3,9mL de solução de DPPH em metanol (100mM). Após a homogeneização, os frascos foram mantidos no escuro por 24 horas para reação. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Jenway, 6700) no comprimento de onda de 517nm. Os resultados foram expressos em percentual de inibição (%).

Para reação frente ao radical ABTS, 100µL do extrato, o mesmo usado para avaliação de compostos fenólicos, foi adicionado à 3,9mL de solução de ABTS. A absorbância foi medida a 734nm em espectrofotômetro após seis minutos de reação (Jenway, 6700). Os resultados foram expressos em percentual de inibição (%).

### **5.7.2 Carotenoides totais**

O teor de carotenoides totais foi analisado usando o método modificado da AOAC (2007). Cem miligramas de amostra liofilizada (Liobras, L101) e macerada em moinho de bola (Marconi, MA 350) foram homogeneizadas com 15mL de solvente extrator (hexano:etanol:acetona:tolueno, 10:6:7:7). Posteriormente, adicionou-se 1mL de hidróxido de potássio 10% (m/v) em metanol, e as amostras foram homogeneizadas em vortex (Phoenix, AP - 56) por um minuto e submetidas a aquecimento em banho-maria (Nova ética, 500/1D) à 56°C por 20 minutos. Após removidas do banho, as amostras permaneceram a temperatura ambiente por 1 hora em ausência de luz. Posteriormente, adicionou-se 15mL de éter de petróleo e 19mL de solução de sulfato de sódio 10% (m/v) em água. Os frascos foram homogeneizados e mantidos no escuro por mais 1 hora. Uma alíquota do sobrenadante foi avaliada em espectrofotômetro (Jenway, 6700) em comprimento de onda de 450nm. Os resultados

foram expressos em mg equivalente de  $\beta$ -caroteno  $100\text{g}^{-1}$  em base seca, baseados em curva de calibração na faixa de  $0,78\text{-}12,5\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 5.7.3 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método baseado na reação com o reagente Folin-Ciocalteu proposto por Swain e Hillis (1959). Para extração, 250mg de amostra liofilizada (Liobras, L101) e macerada em moinho de bola (Marconi, MA 350) foi homogeneizada com 20mL de metanol por uma hora e posteriormente centrifugada por 20 minutos à  $2.000 \times g$  em centrífuga (Sorvall, RC5C) refrigerada à  $4^{\circ}\text{C}$ . Uma alíquota de  $250\mu\text{L}$  do sobrenadante foi misturada com 4mL de água ultra-pura e  $250\mu\text{L}$  do reagente Folin Ciocalteu 0,25N. A mistura foi homogeneizada em vortex (Phoenix, AP-56) e após 3 minutos foram adicionados  $500\mu\text{L}$  de carbonato de sódio 1mol/L. As amostras permaneceram por duas horas à temperatura ambiente em ausência de luz e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Jenway, 6700) no comprimento de onda de 725nm. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico  $100\text{g}^{-1}$  em base seca, calculados a partir de curva de calibração utilizando o padrão de ácido gálico ( $0\text{-}250\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

## 5.8 Metabólitos individuais

### 5.8.1 Teor de ácido ascórbico total

O teor de ácido ascórbico nos frutos de pimenta foi quantificado de acordo com metodologia proposta por Vinci et al. (1995), com modificações. Foram pesados 50 mg de amostra liofilizada e adicionados 5mL de ácido metafosfórico (4% m/v) em água ultrapura. As amostras foram homogeneizadas em vortex por 1 minuto e centrifugadas a  $11.000 \times g$  à  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em filtro seringa de nylon ( $0,22\mu\text{m}$ ) e transferidos para *vials* para posterior análise no sistema LC-ESI-QTOF-MS.

A separação dos ácidos ascórbico e dehidroascórbico foi realizada na coluna Hyperclone ODS C18 (Phenomenex, CA, EUA) utilizando como fases móveis, água ultrapura (eluente A) e metanol (eluente B), acidificadas com 0,085% de ácido fórmico

(v/v). O gradiente de eluição iniciou com 30% B e permaneceu nessa condição até os 7 minutos passou para 100% B, no qual manteve-se até aos 8 minutos, aos 10 minutos foi para 30% B até aos 18 minutos. O fluxo foi de  $0,2\text{mL min}^{-1}$  e a temperatura da coluna foi mantida a  $30^{\circ}\text{C}$ . O espectrômetro de massas foi operado no modo negativo. Os íons monitorados foram: ácido ascórbico ( $[\text{M-H}]^{-}$   $m/z$  175,0248) e ácido dehidroascórbico ( $[\text{M-H}]^{-}$   $m/z$  173,0092). Para a quantificação do ácido ascórbico e dehidroascórbico foram preparadas as curvas de calibração com padrão externo de ácido ascórbico na faixa de  $(2,5\text{-}60\text{ng mL}^{-1})$ . Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g g}^{-1}$  de fruto em massa seca. Para obtenção do valor de ácido ascórbico total, os teores de ácido ascórbico e dehidroascórbico foram somados.

### 5.8.2 Teor de ácido abscísico e derivados

Para determinação do teor de ácido abscísico e derivados nas pimentas, 100mg de amostras foram misturadas com 1mL de metanol grau HPLC 80% em água ultrapura (v/v). A mistura foi homogeneizada em vortex por 10 segundos, centrifugada ( $14.000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos) e o sobrenadante foi coletado. A extração foi repetida e os sobrenadantes foram misturados. O extrato foi filtrado em filtro de seringa de nylon ( $0,22\mu\text{m}$ ) transferidos para *vials* para posterior análise por LC-ESI-QTOF-MS.

A separação e identificação foi realizada de acordo com Perin *et al.* (2018). Para isso, dez microlitros dos extratos de pimenta foram injetados em cromatógrafo a líquido ultra-rápido (Prominence, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Impact HD, Bruker Daltonics, Alemanha). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Hyperclone ODS C18 (Phenomenex, CA, EUA). As fases móveis, água ultrapura (eluente A) e acetonitrila (eluente B), foram acidificadas com 0,1% de ácido fórmico (v/v). O gradiente de eluição iniciou com 20% B, aos 2 minutos aumentou para 30% B, aos 6 minutos para 38% B, aos 8 minutos para 50% B, aos 10 minutos 70% B, aos 12 minutos retornou a 20% B no qual manteve-se até aos 15 minutos. A taxa de fluxo foi de  $0,2\text{mL min}^{-1}$  e a temperatura da coluna foi mantida a  $40^{\circ}\text{C}$ . O espectrômetro de massas foi operado no modo negativo. Os íons monitorados foram: ácido abscísico ( $[\text{M-H}]^{-}$   $m/z$  263,1277), éster glicosilado de ácido abscísico ( $[\text{M-H}]^{-}$   $m/z$  425,1806), ácido faseico ( $[\text{M-H}]^{-}$   $m/z$  279,1232) e ácido dihidrofaseico ( $[\text{M-H}]^{-}$   $m/z$  281,1289). Para

a quantificação do ácido abscísico e derivados foram preparadas as curvas de calibração com padrão externo de ácido abscísico na faixa de (0,5-12ng mL<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em µg g<sup>-1</sup> de fruto em massa seca.

### 5.8.3 Compostos fenólicos e capsaicinoides

A extração dos compostos fenólicos e capsaicinoides foi realizada com 100mg da amostra de pimenta liofilizada e 1.990µL da solução extratora (75% metanol grau HPLC em água ultra-pura com 0,1% de ácido fórmico) e 10µL de reserpina (200µg mL<sup>-1</sup> em metanol) como padrão interno. A mistura foi homogeneizada em vortex por 10 segundos e sonicada a uma frequência de 40kHz em banho de ultrassom (Quimis, Brasil) por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se por 10 minutos a 11.000 × g a 4°C (Eppendorf, 5430). O sobrenadante foi filtrado em filtro seringa de nylon com poro de 0,22µm, transferidos para *vials* e imediatamente injetadas no sistema LC-ESI-QTOF-MS (De Vos *et al.*, 2007).

A separação cromatográfica dos compostos fenólicos e capsaicinoides, foi realizada em coluna Luna C18 (250mm x 4,6mm) (Phenomenex, CA, EUA). As fases móveis para o gradiente de eluição continham água ultrapura acidificada com 0,1% de ácido fórmico v/v (eluente A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico v/v (eluente B). O gradiente utilizado iniciou com 5% B, passou a 90% B aos 15 minutos, foi mantido em 90% por três minutos e retornou à condição inicial de 5% B aos 20 minutos de corrida permanecendo nessa condição por mais 6 minutos. O fluxo foi de 0,2mL min<sup>-1</sup> e a temperatura da coluna foi mantida a 40°C. O espectrômetro de massas foi operado no modo negativo e positivo para análise de compostos fenólicos e capsaicinoides, respectivamente. Os íons monitorados foram: capsaicina ([M+H]<sup>+</sup> *m/z* 306,2064), dihidrocapsaicina ([M+H]<sup>+</sup> *m/z* 308,2220), homocapsaicina ([M+H]<sup>+</sup> *m/z* 320,2220), homodihidrocapsaicina ([M+H]<sup>+</sup> *m/z* 322,2377), nornordihidrocapsaicina ([M+H]<sup>+</sup> *m/z* 280,1907) e nordihidrocapsaicina ou nonivanida ([M+H]<sup>+</sup> *m/z* 294,2064), no modo positivo e ácido vanílico ([M-H]<sup>-</sup> *m/z* 167,0350), ácido gálico ([M-H]<sup>-</sup> *m/z* 169,0142), ácido siríngico ([M-H]<sup>-</sup> *m/z* 197,0455), ácido clorogênico ([M-H]<sup>-</sup> *m/z* 353,0878) e rutina ([M-H]<sup>-</sup> *m/z* 609,1461), no modo negativo. Os capsaicinoides foram quantificados a partir de curva de calibração de capsaicina na faixa de (12,5-300µg mL<sup>-1</sup>). Rutina (39-5000ng mL<sup>-1</sup>), ácido clorogênico (39-5000ng mL<sup>-1</sup>), ácido gálico (39-

5000ng mL<sup>-1</sup>), ácido siríngico (160-5000ng mL<sup>-1</sup>) e ácido vanílico (160-5000ng mL<sup>-1</sup>) foram quantificados a partir de curva de calibração com padrão correspondente ao composto fenólico determinado. Todos os pontos das curvas foram preparados a partir de uma solução estoque e injetados com pontos equidistantes. Os resultados foram expressos em µg g<sup>-1</sup> de fruto em massa seca.

#### **5.8.4 Teor de aminoácidos e açúcares**

##### **5.8.4.1 Extração e derivatização do extrato**

A extração para avaliação do perfil de aminoácidos e açúcares seguiu o método utilizado por Aranha *et al.* (2017). Foram pesados 30mg de amostras de pimenta liofilizadas em microtubos de 2mL e adicionados 1.400µL de metanol grau HPLC resfriado a -20°C. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 10 segundos e agitadas em termomisturador (Eppendorf, termomixer 5436) a 70°C e 900rpm por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 11.000 x g por 10 minutos a 15°C e o sobrenadante foi coletado para tubos falcon de 15mL e adicionado de 1.500µL de água ultrapura a 4°C. 750µL de clorofórmio grau HPLC a -20°C, 10µL de adonitol (0,2mg mL<sup>-1</sup> em água) e 60µL de alanina deuterada (2mg mL<sup>-1</sup> em água). Após homogeneizadas em vortex por 10 segundos, as amostras foram centrifugadas a 2.200 x g por 15 minutos. Após centrifugação, obteve-se duas frações, fração superior (metanol e água) e fração inferior (clorofórmio).

A fração superior foi coletada e transferiu-se 150µL para microtubos de 1,5mL secando-a por arraste aplicando-se nitrogênio gasoso. Após totalmente secas adicionou-se 40µL de reagente de metoxiaminação (cloridrato de metoxiamina a 20mg mL<sup>-1</sup> em piridina) e agitou-se por 2 horas a 37°C em termomisturador. Em seguida, adicionou-se 70µL de MSTFA [N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida] e agitou-se durante 30 minutos a 37°C. A reação foi transferida para *vials* com *inserts* de vidro de 250µL e injetadas imediatamente no GC-MS.

#### 5.8.4.2 Instrumentação e condições analíticas

Para análise, utilizou-se cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS QP2010 Ultra, Shimadzu, Japão) equipado com autoinjeter AOC-20i e biblioteca de espectro de massas NIST 2011. Os parâmetros de injeção, cromatografia e espectrometria de massas foram segundo Aranha *et al.* (2017), com modificações. Foi injetado 1 µL de amostra com temperatura do injetor a 230°C, com razão de *split* para injeção de 1:40. Hélio foi utilizado como gás carreador com fluxo de 2 mL min<sup>-1</sup> e velocidade linear como modo de controle de fluxo. A coluna capilar utilizada foi Rxi-1MS (30m x 0,32mm x 0,25 µm; Restek, USA), que foi mantida com programação isotérmica por 2 minutos à 80°C, rampa de temperatura de 15°C por minuto até 320°C ao qual permaneceu por 4 minutos. Para os parâmetros de espectrometria de massas, as temperaturas da fonte de íons e interface foram de 250°C, faixa de massa de *m/z* 70-600 e 0,2 varreduras por segundo. O tempo de corte do solvente foi definido a partir 3 minutos. A identificação de açúcares e aminoácidos ocorreu através de comparação do tempo de retenção do composto com o padrão externo e a confirmação a partir dos perfis de fragmentação. Apenas os compostos sacarose, frutose e ácido γ-aminobutírico (GABA) foram identificados putativamente, através do seu perfil de fragmentação em comparação com a biblioteca NIST11. Todos os compostos foram quantificados a partir de cálculo por padrão interno. Utilizou-se os padrões de alanina deuterada e adonitol para calcular a concentração de aminoácidos e açúcares, respectivamente.

#### 5.9 Análise estatística dos dados

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial (2 anos × 3 genótipos × 2 tratamentos). Os dados obtidos a partir das avaliações de metabólitos marcadores de estresse, atividade enzimática antioxidantes, parâmetros de maturação e rendimento dos frutos, potencial antioxidante e teor de metabólitos dos genótipos de pimenta em controle e restrição hídrica para as safras de 2016/17 e 2017/18 foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Na presença de significância para interação, os efeitos foram desmembrados aos efeitos simples, na ausência de significância foram

desmembrados os efeitos principais e as médias foram comparadas utilizando o teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ). As análises foram realizadas usando o software SAS 9.4 (*Sas Learning Edition*, 2014). Análise de correlação de Pearson foi realizada entre os caracteres *DREB1A*, *ERF5*, *PUN1* e capsaicinoides totais (CST) e a probabilidade de significância foi testada via teste T através do software R Core Team, 2020.

Aplicou-se a análise de componentes principais (PCA) nas variáveis bioquímicas e metabólicas para facilitar a visualização das variáveis que mais contribuíram para discriminação entre os tratamentos. Os dados foram transformados por escalonamento automático e utilizou-se programa MetaboAnalyst 4.0 (disponível online, <https://www.metaboanalyst.ca/>).



## 6 Resultados

Os resultados a seguir foram expostos conforme a presença de significância para interação de dois ou três fatores. Com relação a interação dos fatores, houve interação tripla (irrigação x genótipo x safra) para as variáveis: sólidos solúveis, ângulo HUE, prolina (folha e fruto), glicina-betaína (folha), potencial osmótico (folha e fruto), fenólicos totais, ácido ascórbico total, ABA e derivados, capsaicinoides (6 compostos), fenólicos individuais (4 compostos), aminoácidos (8 compostos) e açúcares (2 compostos).

Houve interação dupla dos fatores: genótipo x safra para as variáveis massa, pH, acidez total, SOD, APX, peróxido de hidrogênio, MDA, potencial antioxidante (DPPH e ABTS), carotenoides totais, composto fenólico rutina, aminoácidos valina, alanina, prolina, serina e ácido  $\gamma$ -aminobutírico e açúcares glicose, frutose e xilose; irrigação x safra para as variáveis SOD, CAT, APX, MDA, potencial antioxidante (DPPH), composto fenólico rutina e aminoácidos alanina e ácido  $\gamma$ -aminobutírico; e irrigação x genótipo para as variáveis massa, APX, carotenoides totais, composto fenólico rutina, aminoácidos valina, alanina, prolina, serina e ácido  $\gamma$ -aminobutírico e açúcares glicose e xilose.

### 6.1 Parâmetros de rendimento e maturação

A massa fresca dos frutos foi afetada pela restrição hídrica nos genótipos de baixa pungência e sem pungência enquanto o rendimento do genótipo de média pungência não foi afetado (Figura 8a). A massa fresca dos frutos também foi significativamente afetada pelo ano de cultivo. Comparando os dois anos, observou-se que, embora as condições hídricas fossem as mesmas, frutos da safra de 2018 apresentaram menor massa que frutos de 2017, independente do tratamento (Figura 8b).

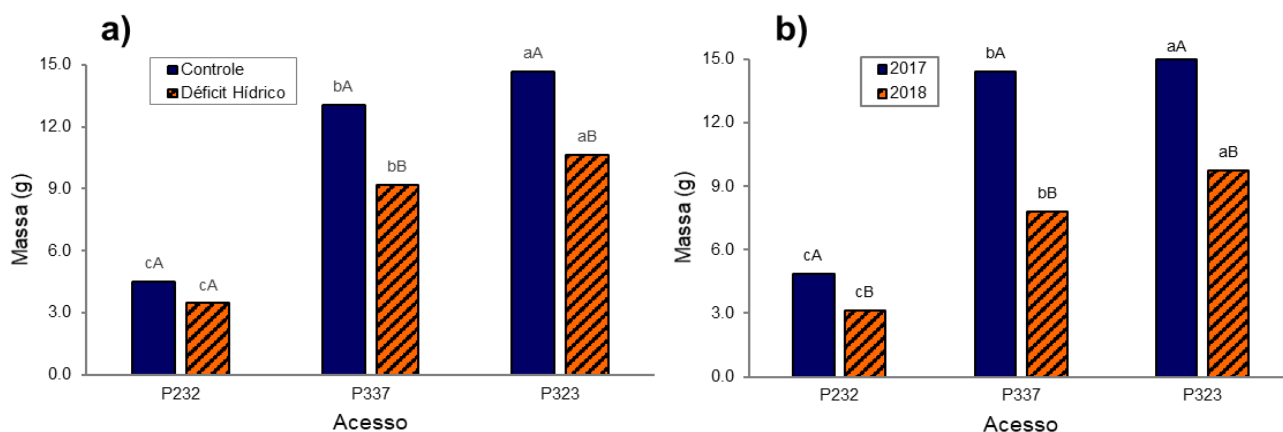


Figura 8. Massa em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P<sup>232</sup> genótipo de média pungência; P<sup>337</sup> genótipo de baixa pungência; P<sup>323</sup> genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana. a) Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). b) Médias de cada genótipo no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo em anos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A restrição hídrica não alterou os teores de pH e acidez total nos frutos em relação ao tratamento controle (resultados não apresentados). Valores médios de pH aumentaram de 5,5 nos frutos cultivados em 2017, para 6,3 nos frutos de 2018 (Figura 9a). O mesmo não foi observado para a acidez total nos genótipos P232 (média pungência) e P323 (sem pungência) (Figura 9b). O genótipo P337 (baixa pungência) apresentou acidez total em cerca de quatro vezes maior em 2018, quando comparados aos frutos cultivados em 2017 (Figura 9b).

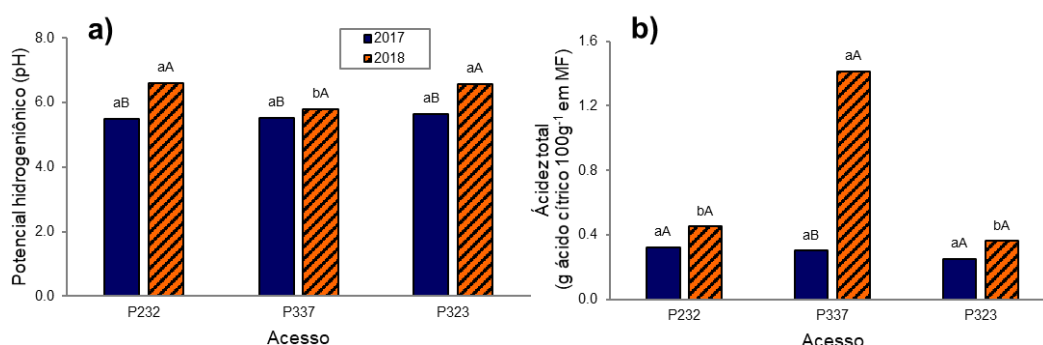


Figura 9. Potencial hidrogeniônico (pH) e acidez total em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P<sup>232</sup> genótipo de média pungência; P<sup>337</sup> genótipo de baixa pungência; P<sup>323</sup> genótipo sem pungência; MF massa fresca. Médias de cada genótipo no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo em anos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Por se tratar de frutos, é esperado que as variações observadas nos teores de sólidos solúveis sejam principalmente relacionadas a mudanças na composição de açúcares. Nas condições avaliadas nesse experimento, foi possível observar que o genótipo de baixa pungência P337 no ano de 2017 e os genótipos P232 (média pungência) e P323 (sem pungência) em 2018 apresentaram maior teor de sólidos solúveis em condição estressora quando comparados ao controle (Figura 10a).

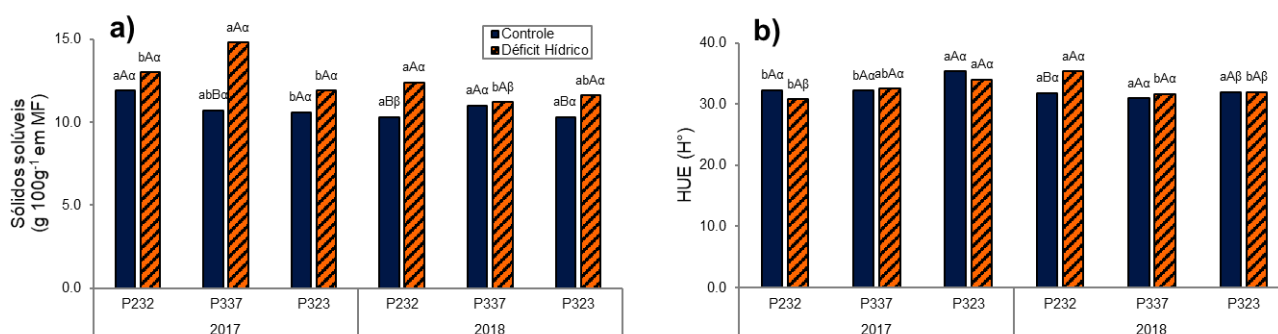


Figura 10. Sólidos solúveis e ângulo HUE (0° = vermelho; 90° = amarelo; 180° = verde e 270° = azul) em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P<sub>232</sub> genótipo de média pungência; P<sub>337</sub> genótipo de baixa pungência; P<sub>323</sub> genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; <sup>MF</sup> massa fresca. Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento e no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes no mesmo ano, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). Médias do mesmo genótipo submetidas ao mesmo tratamento em anos diferentes, acompanhadas por letras gregas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

O ângulo HUE representa a escala de variação da cor com valores entre 0 e 360 graus. As pimentas apresentaram valores de HUE próximos a 30°, o que representa a coloração vermelha intensa migrando para vermelho alaranjado (Figura 10b). Os resultados de ângulo HUE indicam que a cor das pimentas não foi influenciada pelo tratamento ou ano de cultivo de forma igualitária nos genótipos. Frutos do genótipo sem pungência P323 apresentaram redução do ângulo HUE no ano de cultivo de 2018 em comparação a 2017, para ambos os tratamentos controle e déficit hídrico. No ano de 2018, o déficit hídrico promoveu aumento do ângulo HUE no genótipo de média pungência P232, quando comparado ao tratamento controle no mesmo ano (Figura 10b).

## 6.2. Quantificação relativa de transcritos e regulação da transcrição dos genes *DREB1A*, *ERF5* e *PUN1*

Os genes de resposta a condições de estresse *DREB1A* e *ERF5* responderam de maneira distinta frente ao déficit hídrico. Em ambas as safras, o gene *DREB1A* apresentou menor expressão relativa sob déficit hídrico nos frutos de *Capsicum baccatum*, com exceção do genótipo sem pungência P323 no ano de cultivo 2017 (Figura 11a). *DREB1A* teve maior expressão nos frutos dos três genótipos cultivados em 2018 para ambos os tratamentos (controle e déficit hídrico) em comparação com 2017. Exceto para o genótipo P323 sob déficit hídrico, quando a menor expressão foi observada em 2018 (Figura 12a).

O gene *ERF5* foi mais expresso sob déficit hídrico, principalmente no ano de 2017 (Figura 11b). No ano de cultivo de 2018, o gene *ERF5* apresentou maior expressão apenas nos frutos dos genótipos P232 (média pungência) e P337 (baixa pungência) sob déficit hídrico (Figura 11b). Com relação ao ano de cultivo, para os três genótipos foi observado menor expressão relativa dos transcritos de *ERF5* em 2018 (Figura 12b).

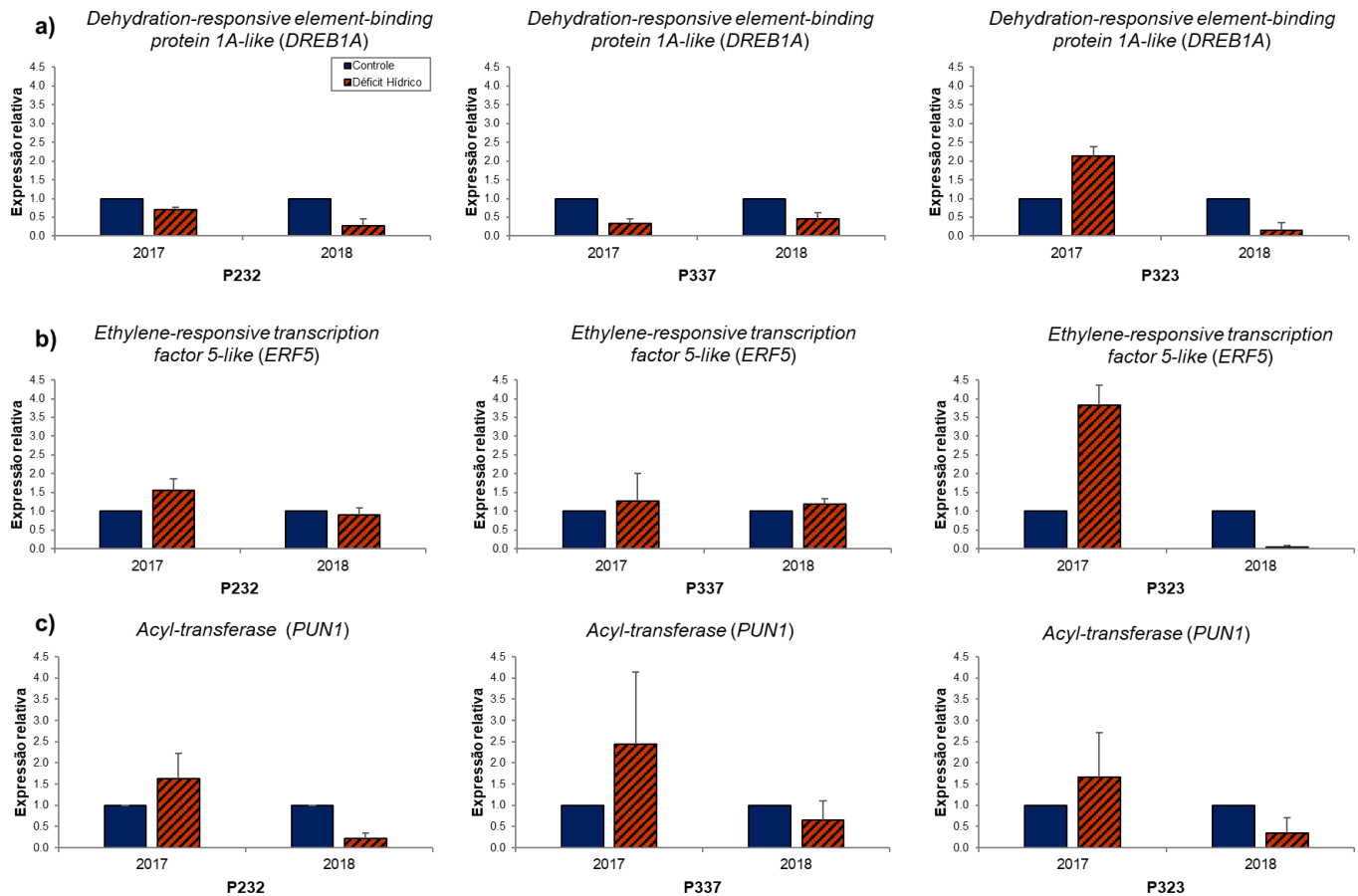


Figura 11. Interferência do déficit hídrico no acúmulo de transcritos dos genes *DREB1A*, *ERF5* e *PUN1* em frutos de *Capsicum baccatum* com distintos graus de pungência cultivados em duas safras. Resultados expressos em expressão relativa ao seu tratamento controle. P232 genótipo de média pungência; P337 genótipo de baixa pungência; P323 genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana. Valores de desvio padrão estão representados por barras.

O déficit hídrico proporcionou aumento no acúmulo de transcritos do gene *PUN1* para os três genótipos de pimenta quando cultivadas em 2017 (Figura 11c). No entanto, em 2018 a expressão relativa deste gene foi menor sob condição de déficit hídrico quando comparado ao tratamento controle (Figura 11c). Observou-se maior expressão relativa de transcritos do gene *PUN1* no ano de 2018 em comparação a 2017, para o tratamento controle e para o genótipo P337 sob déficit hídrico (Figura 12c).

A partir da observação da região a montante dos genes *DREB1A*, *ERF 5* e *PUN1*, verificou-se em mil pares de bases dos promotores preditos, a ocorrência de elementos regulatórios de ação *cis* (ERACs). Os ERACs, são reconhecidos e ligados por fatores de transcrição envolvidos no controle da expressão gênica, sinalizada a partir de diversos estímulos. Cento e dezesseis ERACs foram identificados entre os

promotores dos três genes avaliados. Os ERACs encontrados não eram necessariamente comuns a todos os promotores dos três genes. Dentre as funções associadas a esses elementos, observou-se ERACs de funções constitutivas, de controle da transcrição em tecidos específicos e de resposta à estímulos ambientais, hormonais e de estresse bióticos ou abióticos (Tabela 2).

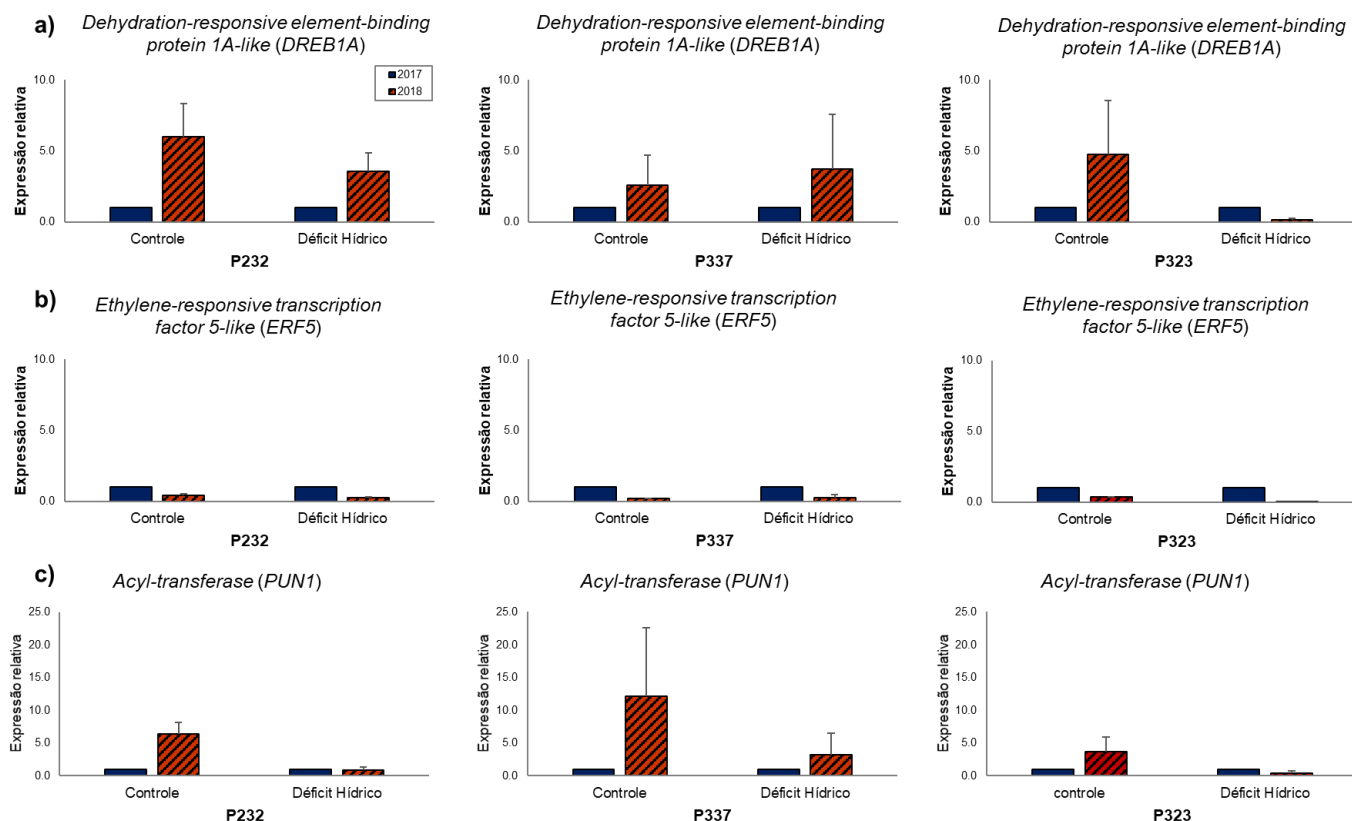


Figura 12. Diferença entre safras no acúmulo de transcritos dos genes *DREB1A*, *ERF5* e *PUN1* em frutos de *Capsicum baccatum* com distintos graus de pungência em condição de estresse por déficit hídrico. Resultados expressos em expressão relativa à safra 2017 no mesmo tratamento. <sup>P232</sup> genótipo de média pungência; <sup>P337</sup> genótipo de baixa pungência; <sup>P323</sup> genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana. Valores de desvio padrão estão representados por barras.

Na figura 13, podem ser observados os vinte e oito ERACs selecionados devido a presença de sequências de ligação para fatores de transcrição sabidamente envolvidos na sinalização da resposta ao estresse osmótico. Esses fatores de transcrição podem atuar de forma dependente ou independente do fito-hormônio ABA. De maneira dependente de ABA, elementos *cis* ABRE (do inglês: *Abscisic acid-responsive element*), alvo de ligação do fator de transcrição AREB/ABF (do inglês: *Abscisic acid-responsive elemento-binding protein/ABRE-binding fator*) estavam presentes através de seis sequências nos promotores dos genes estudados. Embora,

os promotores dos genes *DREB1A* e *ERF5* tenham apresentado no mínimo dois tipos de ABRE, a maior frequência de ABREs foi observada no promotor do gene *PUN1*, principalmente para o elemento *cis* 'ABRERATCAL'.

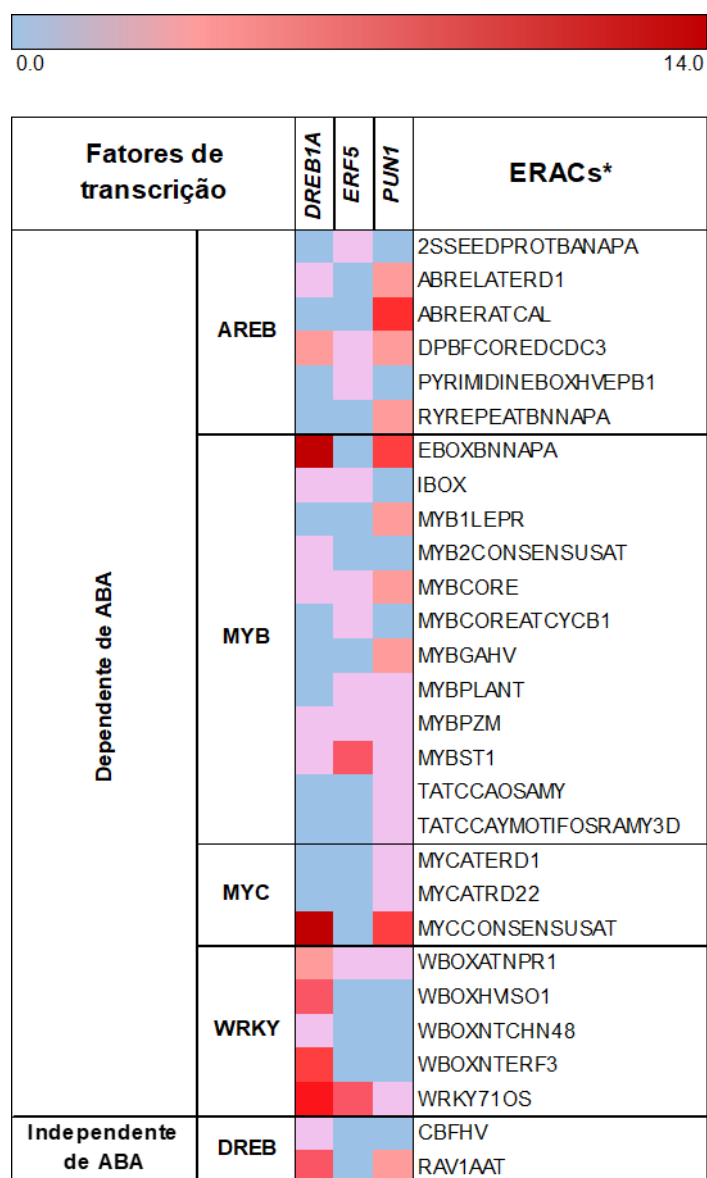


Figura 13. Mapa de calor com os diferentes elementos *cis* preditos encontrados nas regiões de 1 Kb a montante dos genes *DREB1A*, *ERF5* e *PUN1*. Na escala de cores, quanto maior a intensidade de vermelho maior a frequência do elemento e azul representa a ausência; \* Elementos regulatórios de ação *cis*.

Ainda de maneira dependente de ABA, foram encontrados mais três grupos de ERACs, que são reconhecidos e ligados pelos fatores de transcrição MYB, MYC e WRKY. Foram observados apenas três tipos de elementos *cis* reconhecidos pelo fator de transcrição MYC. ERACs alvos do fator de transcrição MYC não estavam presentes no promotor do gene *ERF5*. Apenas um tipo de elemento *cis* ('MYCCONSUSAT'),

sítio do fator de transcrição MYC, foi observado no promotor do gene *DREB1A*, com frequência igual a quatorze (número de vezes que esse elemento estava presente no promotor). No promotor do gene *PUN1* foram encontrados os três tipos de ERACs alvo de MYC, com diferentes números de ocorrências (Figura 13).

Foram observados doze tipos de ERACs, alvos do fator de transcrição MYB, dos quais a maioria estava presente no promotor predito o gene *PUN1*. O elemento *cis* 'EBOXBNNAPA' apresentou a maior frequência nos promotores preditos dos genes *DREB1A* e *PUN1*, mas não foi observado no promotor do gene *ERF5*. Verificou-se a presença de cinco ERACs alvos do fator de transcrição WRKY, presentes principalmente no promotor do gene *DREB1A*, com a menor frequência entre os demais promotores dos genes estudados (Figura 13).

Considerando a via de sinalização independente de ABA, ou seja, fatores de transcrição DREB, foi possível verificar que os promotores dos genes estudados apresentaram apenas dois tipos de ERACs DRE/CTR (do inglês: *dehydration-responsive element/C-repeat*). O gene *ERF5* não apresenta nenhum elemento *cis* alvo de ligação de DREB e o gene *PUN1* apresenta um. Os dois tipos de DRE, alvos de DREB foram encontrados na região promotora do gene *DREB1A*.

### **6.3. Caracterização das respostas bioquímicas e metabólicas das pimentas ao déficit hídrico**

#### **6.3.1 Metabólitos marcadores de condição de estresse**

Com o objetivo de mensurar o grau de estresse causado às plantas submetidas a déficit hídrico foram avaliados em folhas e frutos os parâmetros bioquímicos indicadores de estresse: potencial osmótico e teores de glicina-betaína e prolina. Plantas sob restrição hídrica não diferiram de plantas controle quanto ao acúmulo de glicina-betaína nos frutos. Foram observadas diferenças apenas entre os genótipos estudados. Da mesma maneira, a avaliação do teor de glicina-betaína nas folhas de pimenta não demonstrou potencial como marcador da condição de estresse hídrico nos genótipos avaliados de *Capsicum baccatum* (Figura 14). Os teores de glicina-betaína em pimentas foram em média de 84,30  $\mu\text{g g}^{-1}$  de frutos e 87,74  $\mu\text{g g}^{-1}$  de folha (Figura 14).



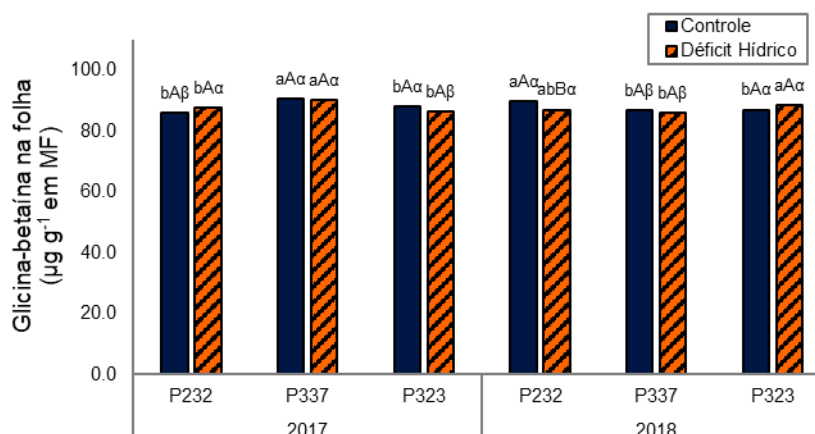


Figura 14. Glicina-betaina na folha de *Capsicum baccatum* sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P232 genótipo de média pungência; P337 genótipo de baixa pungência; P323 genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MF massa fresca. Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento e no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes no mesmo ano, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo submetidas ao mesmo tratamento em anos diferentes, acompanhadas por letras gregas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O déficit hídrico não causou diferenças no acúmulo de prolina nas folhas de plantas cultivadas em 2017 (Figura 15a). Durante o déficit hídrico, em 2018, os genótipos P232 (média pungência) e P337 (baixa pungência) tiveram seus teores de prolina aumentados em folhas. Nos frutos esses resultados foram observados apenas para o genótipo P337 (baixa pungência). Em 2018, frutos do genótipo sem pungência P323 apresentaram o maior teor de prolina, seguido pelo genótipo de baixa pungência P337 e P232 (média pungência) com menores teores. Sob déficit hídrico, quando cultivados em 2017 os genótipos P323 e P337 não diferiram quanto ao teor de prolina nos frutos (Figura 15b). O teor de prolina aumentou significativamente nas pimentas cultivadas no ano de 2018, quando comparado a 2017 (Figura 15a e 15b). Estes resultados foram observados tanto nas folhas (2017 – 0,01 mmol g<sup>-1</sup>; 2018 – 0,16 mmol g<sup>-1</sup>) quanto nos frutos (2017 – 0,05 mmol g<sup>-1</sup>; 2018 – 0,16 mmol g<sup>-1</sup>).

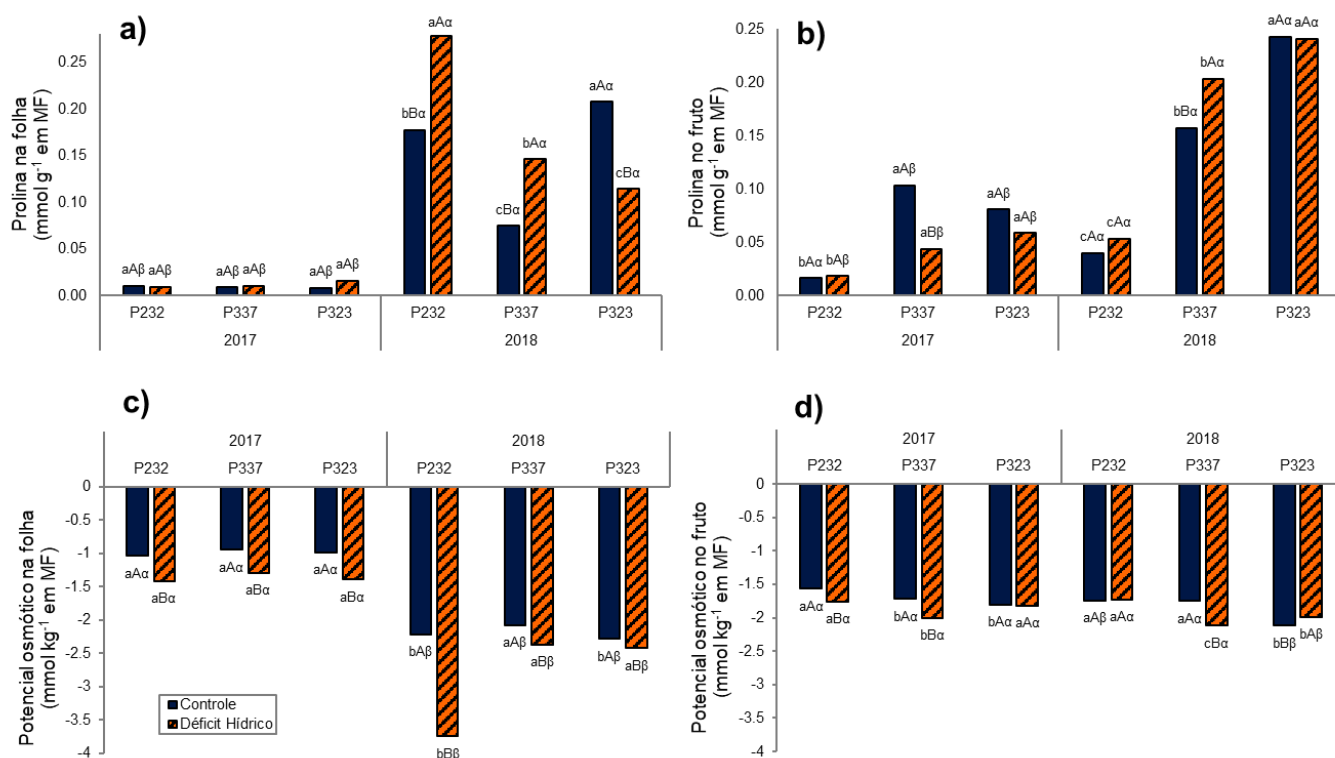


Figura 15. Teor de prolina e potencial osmótico em folha e fruto em *Capsicum baccatum* sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P232 genótipo de média pungência; P337 genótipo de baixa pungência; P323 genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MF massa fresca. Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento e no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes no mesmo ano, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo submetidas ao mesmo tratamento em anos diferentes, acompanhadas por letras gregas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Folhas de plantas sob déficit hídrico apresentaram menor potencial osmótico em comparação ao tratamento controle (Figura 15c). Nos frutos, o déficit hídrico promoveu redução do potencial osmótico nos genótipos P232 (média pungência) e P337 (baixa pungência) cultivados em 2017 e P337 (baixa pungência) cultivado em 2018. Em 2018, frutos de pimentas sem pungência (P323) cultivadas sob déficit hídrico apresentaram maior potencial osmótico do que frutos de plantas controle (Figura 15d). O potencial osmótico das folhas foi significativamente influenciado pelo ano de cultivo. Folhas de plantas cultivadas em 2017 apresentaram maiores valores de potencial osmótico quando comparadas a folhas de plantas cultivadas em 2018 (Figura 15c).

### 6.3.2 Atividade de enzimas antioxidante e metabólitos indicadores de estresse oxidativo

Foram avaliadas a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) nos frutos de *Capsicum baccatum* a fim de avaliar as respostas do mecanismo de defesa da planta em déficit hídrico (Figuras 16, 17 e 18). Também foram avaliadas a concentração de peróxido de hidrogênio, que é um produto da ação da superóxido dismutase e eliminado via atividade da catalase e peroxidase e a concentração de malondialdeído que é produto de peroxidação lipídica.

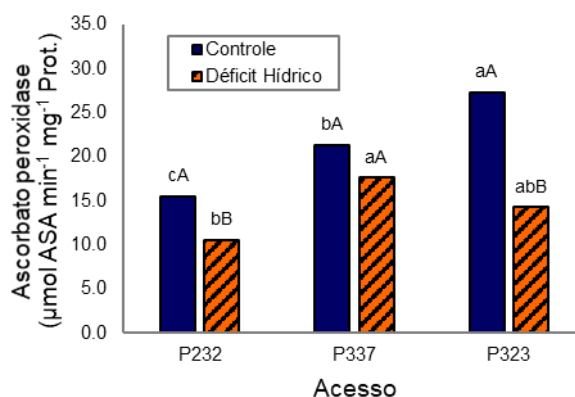


Figura 16. Atividade da enzima ascorbato peroxidase em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. <sup>P232</sup> genótipo de média pungência; <sup>P337</sup> genótipo de baixa pungência; <sup>P323</sup> genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana. Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A atividade da enzima APX nos frutos foi significativamente afetada pelo déficit hídrico aplicado nas plantas. A redução do aporte hídrico resultou na menor atividade da enzima APX nos genótipos P232 (média pungência) e P323 (sem pungência) (Figura 16). Independentemente do genótipo, o déficit hídrico promoveu a redução da atividade das enzimas SOD, CAT e APX apenas no ano de cultivo de 2017 (Figura 17a e 17b). A maior atividade dessas enzimas foi observada nos frutos de plantas cultivadas em 2017 em relação a 2018, para ambos os tratamentos (controle e déficit hídrico) (Figura 17). A safra influenciou significativamente a atividade das enzimas

SOD e APX, resultando em maior atividade nos frutos de plantas cultivadas no ano de 2017 em comparação a 2018 (Figura 18a e 18b).

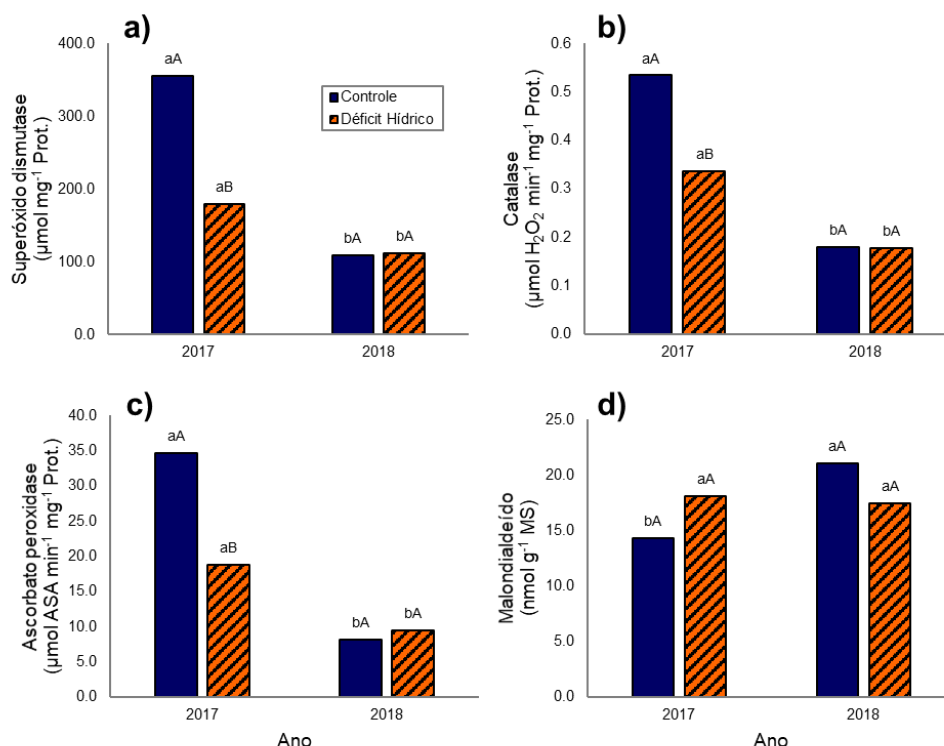


Figura 17. Atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase e teor de malondialdeído em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MF massa fresca. Médias de cada ano submetidas ao mesmo tratamento, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Médias do mesmo ano, submetidas a tratamentos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

O tratamento por déficit hídrico resultou no aumento do teor de malondialdeído apenas no ano de cultivo de 2017, independente do genótipo (Figura 17d). Para peróxido de hidrogênio, no genótipo de média pungência P232 o maior acúmulo foi verificado no ano de 2018. Mesmo que essa tendência tenha sido observada para os genótipos P337 (baixa pungência) e P323 (sem pungência), as diferenças de concentração entre os anos não foram significativas (Figura 18c). O mesmo foi observado para o acúmulo de malondialdeído com relação ao genótipo de média pungência (P232), com concentração significativamente maior em 2018 (Figura 18d).

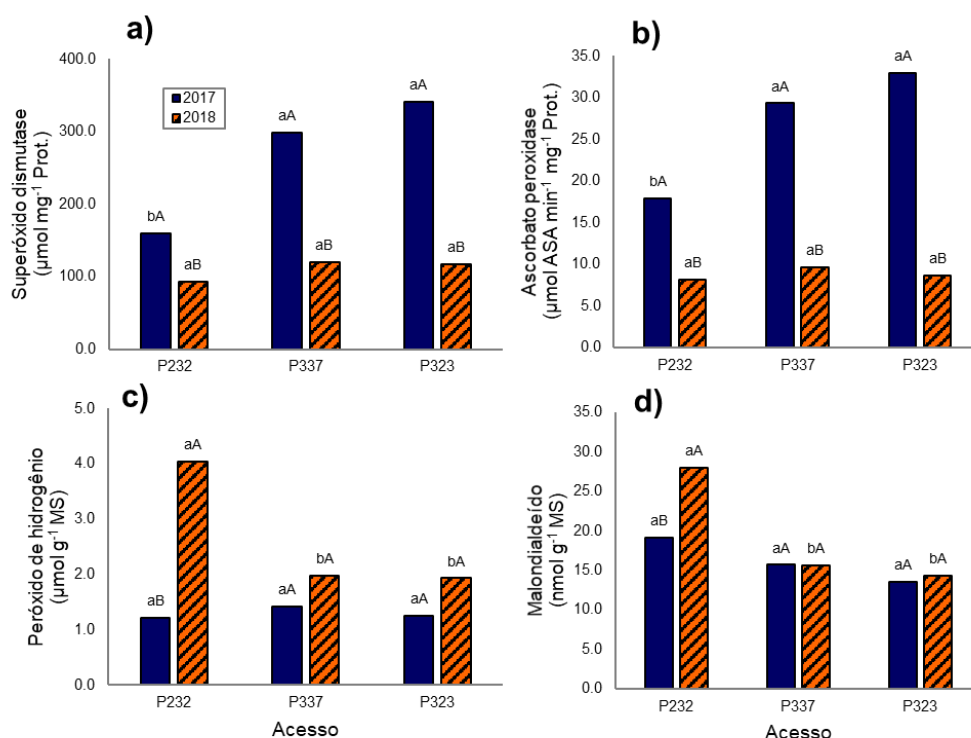


Figura 18. Atividade das enzimas superóxido dismutase e ascorbato peroxidase e teor de peróxido de hidrogênio e malondialdeído em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P<sub>232</sub> genótipo de média pungência; P<sub>337</sub> genótipo de baixa pungência; P<sub>323</sub> genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MF massa fresca. Médias de cada genótipo no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo em anos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 6.3.3 Atividade antioxidante e teor de metabólitos

O potencial antioxidante das pimentas foi avaliado *in vitro*, a partir da determinação da capacidade de extratos metanólicos dos frutos de capturar os radicais livres ABTS e DPPH. Os extratos apresentaram maior capacidade de captura do radical ABTS (76%), em comparação ao radical DPPH (26%) (Figura 19 e 20). Na estabilização do radical ABTS, pimentas cultivadas em 2017 apresentaram maior potencial antioxidante em comparação a 2018, independente do tratamento (Figura 19). Independente do genótipo estudado, a restrição hídrica em 2018 induziu a maior capacidade antioxidante por inibição do radical DPPH em comparação ao controle, tais resultados não foram observados para o ano de 2017 (Figura 20a). O potencial de inibição do radical DPPH do genótipo sem pungência P323 foi maior no ano de 2018, o inverso ocorreu para o genótipo de baixa pungência P337, que apresentou maior inibição para os frutos cultivados em 2017 (Figura 20b).

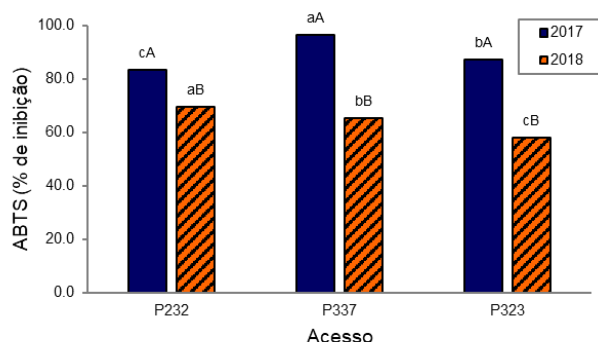


Figura 19. Potencial antioxidante por captura do radical ABTS (% de inibição) em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. <sup>P232</sup> genótipo de média pungência; <sup>P337</sup> genótipo de baixa pungência; <sup>P323</sup> genótipo sem pungência. Médias de cada genótipo no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo em anos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Carotenoides e compostos fenólicos totais foram avaliados para observar as respostas do metabolismo especializado das plantas de pimenta frente a condição de estresse por déficit hídrico nos dois anos de cultivo (safras 2016/17 e 2017/18). O experimento demonstrou que o acúmulo do teor de carotenoides nos frutos durante a restrição hídrica ocorreu de maneira dependente do genótipo (Figura 21a). Os genótipos P232 (média pungência) e P323 (sem pungência) apresentaram redução do teor de carotenoides em condição estressora quando comparados ao tratamento controle. Contrário a isso, frutos de plantas do genótipo baixa pungência P337 apresentaram aumento no teor de carotenoides totais quando cultivadas sob restrição hídrica (Figura 21a). Independente do tratamento, o ano de cultivo influenciou no acúmulo de carotenoides, sendo em 2018 o teor de carotenoides nos frutos praticamente o dobro em comparação ao ano de 2017 (Figura 21b).

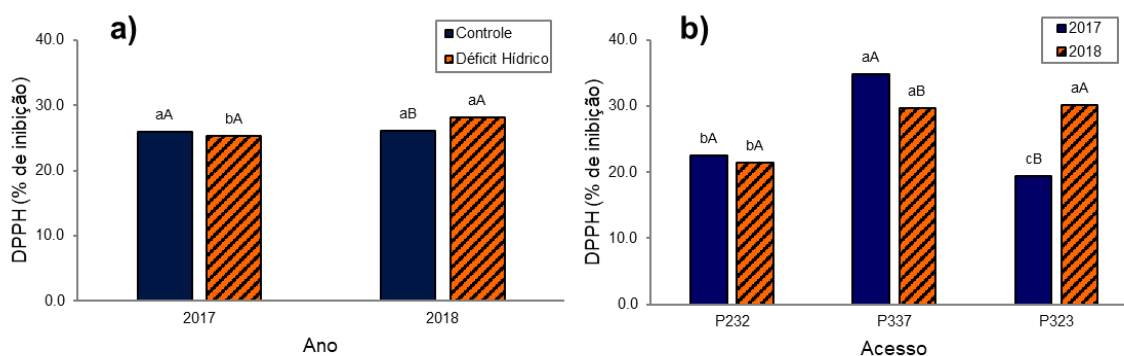


Figura 20. Potencial antioxidante por DPPH (% de inibição) em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; P<sub>232</sub> genótipo de média pungência; P<sub>337</sub> genótipo de baixa pungência; P<sub>323</sub> genótipo sem pungência. a) Médias de cada ano submetidas ao mesmo tratamento, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo ano, submetidas a tratamentos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). b) Médias de cada genótipo no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo em anos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

De maneira geral, o tratamento por redução do aporte hídrico não alterou o teor de fenólicos totais das pimentas, nos dois anos de cultivo. Independentemente do tratamento, o genótipo de baixa pungência P337 apresentou maior teor de compostos fenólicos totais no ano de 2017. Em 2018, os frutos do genótipo de média pungência P232 apresentaram maior teor de compostos fenólicos totais sob déficit hídrico, quando comparado ao tratamento controle (Figura 22a).

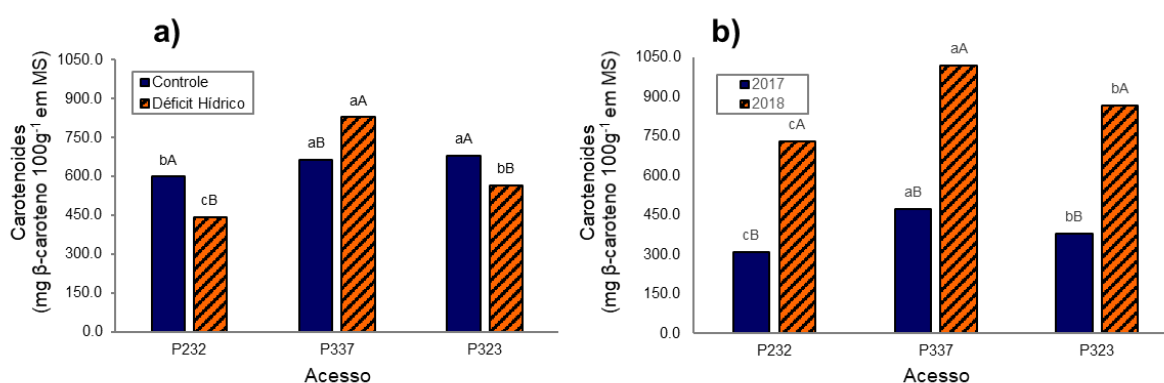


Figura 21. Carotenoides em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P<sub>232</sub> genótipo de média pungência; P<sub>337</sub> genótipo de baixa pungência; P<sub>323</sub> genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MS massa seca. a) Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). b) Médias de cada genótipo no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo em anos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



O teor de ácido ascórbico total (vitamina C) foi obtido a partir da soma dos ácidos ascórbico e dehidroascórbico (Figura 22b). O genótipo de baixa pungência P337 apresentou maior teor de ácido ascórbico total nos frutos de plantas controle, quando comparado as plantas em déficit hídrico, nos dois anos de cultivo e foi o genótipo com maior acúmulo desses compostos. O genótipo de média pungência P232 não foi afetado pelo déficit hídrico quanto ao teor de ácido ascórbico total em ambos os anos de cultivo. O genótipo sem pungência P323 acumulou maior teor de ácido ascórbico total nas pimentas em déficit hídrico no ano 2017 e no ano de 2018 em pimentas de tratamento controle (Figura 22b).

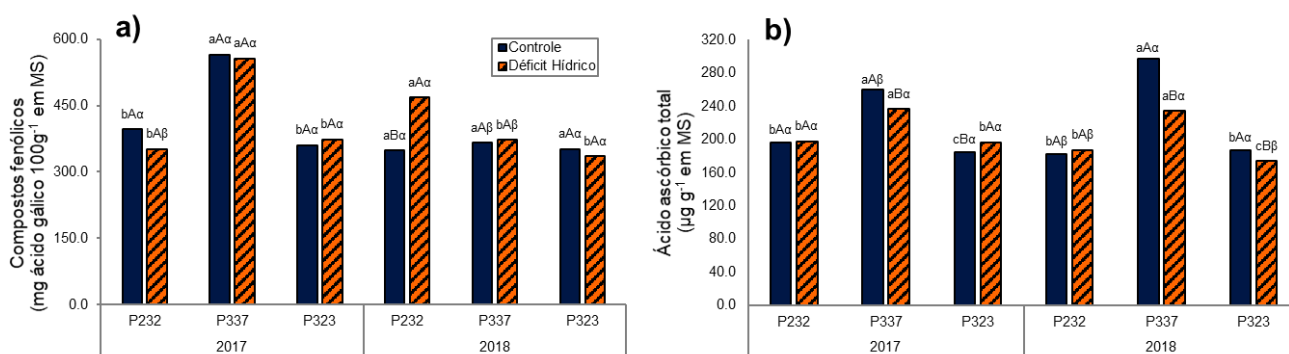


Figura 22. Compostos fenólicos e ácido ascórbico total em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P232 genótipo de média pungência; P337 genótipo de baixa pungência; P323 genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MS massa seca. Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento e no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes no mesmo ano, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo submetidas ao mesmo tratamento em anos diferentes, acompanhadas por letras gregas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O ácido abscísico (ABA) e seus derivados foram avaliados a fim de observar as respostas dos três genótipos de pimenta à condição de estresse por déficit hídrico em dois anos de cultivo (Figura 23). A restrição hídrica promoveu redução no teor de ABA apenas nos genótipos P337 (baixa pungência) e P323 (sem pungência), porém nesse segundo genótipo essa performance foi observada apenas no ano de 2017. Em 2018, houve aumento de ABA no genótipo P323 cultivado sob déficit hídrico. O genótipo de média pungência P232 não teve o teor de ABA alterado pelo déficit hídrico ou ano de cultivo, e apresentou a menor concentração do fito-hormônio dentre os genótipos avaliados nesse experimento (Figura 23a). No ano de cultivo de 2018 o genótipo P337 (baixa pungência) apresentou maior teor de ABA em relação ao ano



2017 (Figura 23a). O mesmo resultado foi observado para o genótipo sem pungência P323, apenas na condição de déficit hídrico.

O éster glicosilado de ácido abscísico (EGABA) é uma forma de armazenamento desse fito-hormônio por parte das plantas. Pimentas de plantas sob déficit hídrico apresentaram aumento no teor de EGABA em relação a pimentas de plantas controle. Apenas o genótipo P232 (média pungência), cultivado no ano de 2017 apresentou redução no teor de EGABA sob déficit hídrico quando comparado ao controle (Figura 23b). De maneira geral, os genótipos quando cultivados em 2018 apresentaram maior teor de EGABA em relação ao ano anterior, de 2017 (Figura 23b). Éster glicosilado de ácido abscísico foi a forma mais abundante encontrada entre ácido abscísico e derivados, apresentando o maior teor entre esses compostos (Figura 23).

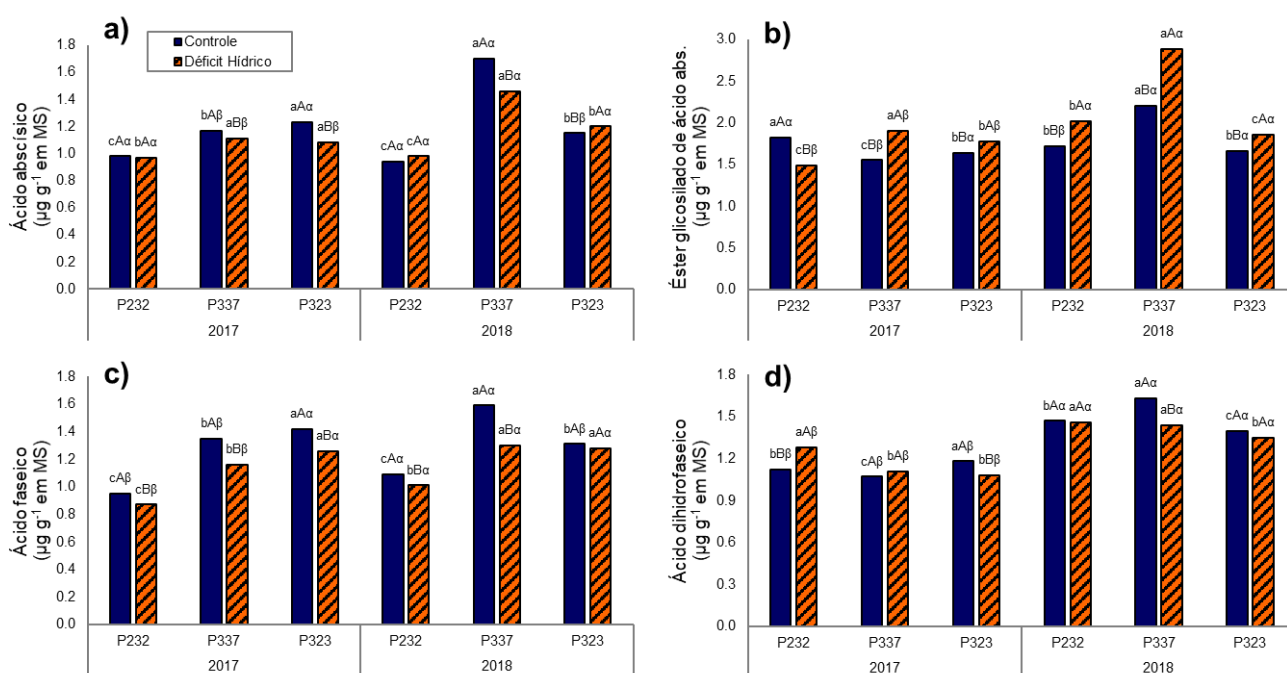


Figura 23. Concentração de ácido abscísico, éster glicosilado de ácido abscísico, ácido faseico e ácido dihidrofaseico em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P232 genótipo de média pungência; P337 genótipo de baixa pungência; P323 genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MS massa seca. Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento e no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes no mesmo ano, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo submetidas ao mesmo tratamento em anos diferentes, acompanhadas por letras gregas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Ácidos faseico e dihidrofaseico são compostos de degradação do ácido abscísico. O teor de ácido faseico foi reduzido em pimentas de plantas cultivadas sob

déficit hídrico quando comparadas ao tratamento controle (Figura 23c). Performance diferente foi obtida pelo genótipo P323 (sem pungência) quando cultivado no ano de 2018, em que não foram observadas diferenças significativas. Assim como para o ABA, o genótipo P232 (média pungência) também apresentou menor teor de ácido faseico em relação aos demais genótipos estudados (Figura 23c). O déficit hídrico promoveu redução de ácido dihidrofaseico no genótipo P323 em 2017 e P337 em 2018. Um aumento significativo de ácido dihidrofaseico foi observado no genótipo P232 sob déficit hídrico em relação ao controle, apenas no ano de 2017 (Figura 23d). O teor de ácido dihidrofaseico foi significativamente maior em pimentas cultivadas no ano de 2018, quando comparadas ao ano de cultivo anterior (2017) (Figura 23d).

Foram quantificados cinco compostos fenólicos nas amostras de pimenta, dos quais quatro são ácidos fenólicos (Figura 24) e um flavonoide (Figura 25). O teor de ácido clorogênico foi em média de  $16,83 \mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca de pimenta. O déficit hídrico promoveu aumento no conteúdo de ácido clorogênico nos genótipos de pimenta, exceto no genótipo P337 (baixa pungência) quando cultivado no ano de 2018. Na safra de 2018, pimentas do genótipo de média pungência P232 cultivadas sob déficit hídrico, apresentaram teores duas vezes maior de ácido clorogênico que os demais genótipos (Figura 24a). De modo geral, pimentas cultivadas no ano de 2018 apresentaram maior teor de ácido clorogênico quando comparadas as cultivadas em 2017, com exceção do genótipo de baixa pungência P337 (Figura 24a). O ácido gálico não apresentou uma resposta regular nos três genótipos de pimenta cultivados sob déficit hídrico em duas safras (Figura 24b). Valores médios de  $2,62 \mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca de pimenta foram observados para ácido gálico.

O ácido siringico apresentou valores médios de  $25,57 \mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca de pimenta. No ano de 2017, os genótipos P232 (média pungência) e P337 (baixa pungência) apresentaram um aumento no teor de ácido siringico em pimentas cultivadas sob restrição hídrica em comparação ao tratamento controle (Figura 24c). A mesma performance foi observada em pimentas do genótipo sem pungência P323 cultivado em 2018. O genótipo P337 (baixa pungência) apresentou redução do teor de ácido siringico sob restrição hídrica em comparação ao tratamento controle no ano de 2018 (Figura 24c).

O déficit hídrico promoveu aumento no teor de ácido vanílico nos genótipos P232 (média pungência) e P323 (sem pungência) cultivados no ano de 2017 (Figura

24d). O genótipo P232 (média pungência) apresentou maior acúmulo de ácido vanílico em relação aos demais genótipos, em ambos os anos de cultivo. Observou-se valores médios de ácido vanílico de  $16,22 \mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca de pimenta (Figura 24d).

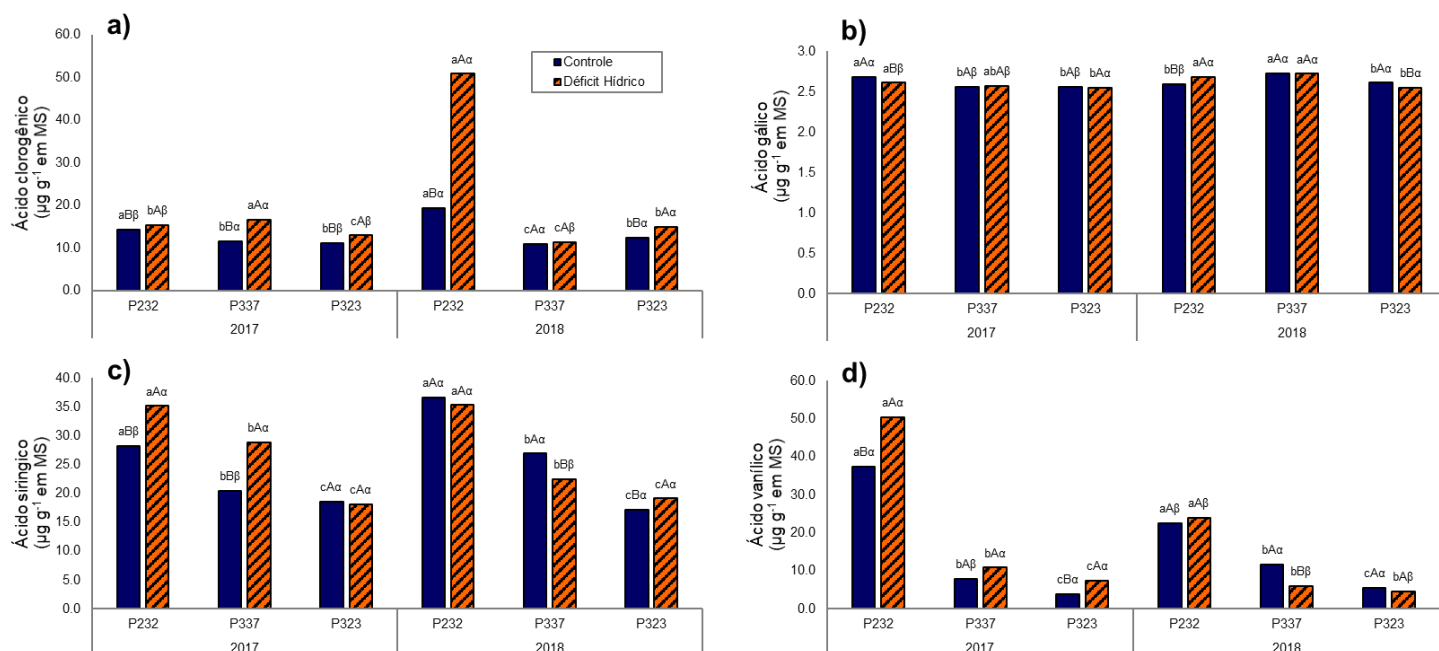


Figura 24. Perfil de ácidos fenólicos em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P232 genótipo de média pungência; P337 genótipo de baixa pungência; P323 genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MS massa seca. Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento e no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes no mesmo ano, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo submetidas ao mesmo tratamento em anos diferentes, acompanhadas por letras gregas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A restrição hídrica promoveu aumento no teor de rutina apenas no genótipo de baixa pungência P337, independentemente do ano de cultivo (Figura 25a). A safra influenciou no acúmulo de rutina, independente do aporte hídrico. Pimentas coletadas em 2018 apresentaram maiores teores de rutina em comparação ao ano de 2017 (Figura 25b). O genótipo de baixa pungência P337 apresentou maior teor do flavonoide, seguido por P232 (média pungência) e P323 (sem pungência), (Figura 25a e 25b). Na safra de 2018 o déficit hídrico promoveu aumento do teor de rutina quando comparado ao tratamento controle (Figura 25c). O déficit hídrico promoveu aumento no teor de rutina no ano de 2018 em relação ao ano de cultivo de 2017, em ambos os tratamentos. Valores médios de rutina  $9,42 \mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca de pimenta foram observados.

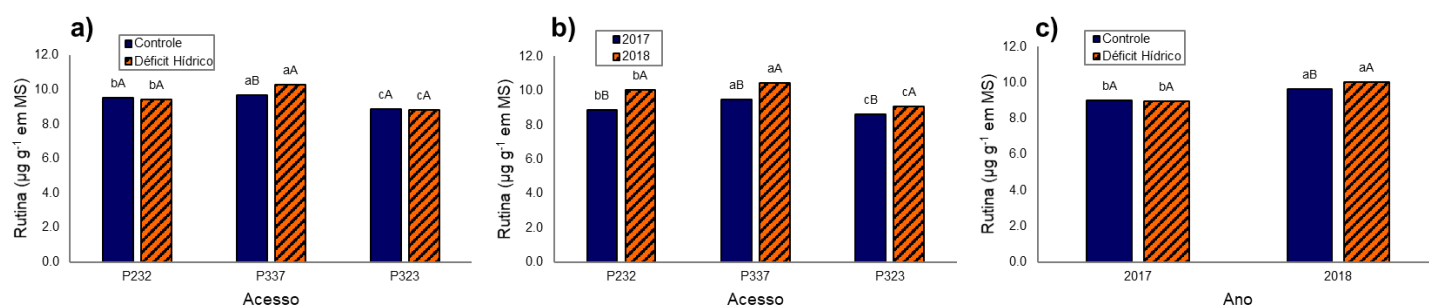


Figura 25. Rutina em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P232 genótipo de média pungência; P337 genótipo de baixa pungência; P323 genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MS massa seca. (a) Médias de cada genótipo no mesmo tratamento, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ); Médias do mesmo genótipo em tratamentos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). (b) Médias de cada genótipo no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ); Médias do mesmo genótipo em anos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). (c) Médias de cada ano no mesmo tratamento, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ); Médias do mesmo tratamento em anos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Foram identificados seis compostos capsaicinoides (capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina, homodihidrocapsaicina e nornordihidrocapsaicina) em pimentas cultivadas nas duas safras (2016/17 e 2017/18), mantidas em condições controle e sob déficit hídrico (Figura 23). O genótipo de média pungência P232 apresentou maior teor de capsaicinoides totais, seguido pelo genótipo de baixa pungência P337. Não foram detectados capsaicinoides no genótipo sem pungência P323 (Figura 26).

Capsaicina apresentou as maiores concentrações dentre os seis compostos capsaicinoides identificados, com valores médios que variaram entre 64,7 até 898,9  $\mu\text{g g}^{-1}$  de pimenta em massa seca (Figura 26a). O segundo capsaicinoide mais abundante foi a dihidrocapsaicina, com valores entre 38,2 e 365,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  de pimenta em massa seca (Figura 26b). Capsaicina (60,0%) e dihidrocapsaicina (23,6%) representaram juntas 83,6% do total de capsaicinoides analisados (P232 – 81,5% e P337 - 88,1%). O composto nordihidrocapsaicina (Figura 26c), representou 7,5% do total de capsaicinoides. Homocapsaicina e homodihidrocapsaicina representaram respectivamente, 4,0% e 4,7% do total de capsaicinoides (Figura 26d e 26e). O composto nornordihidrocapsaicina foi detectado apenas no genótipo de média pungência P232 (Figura 26f) e sua representação foi inferior a 0,1%.

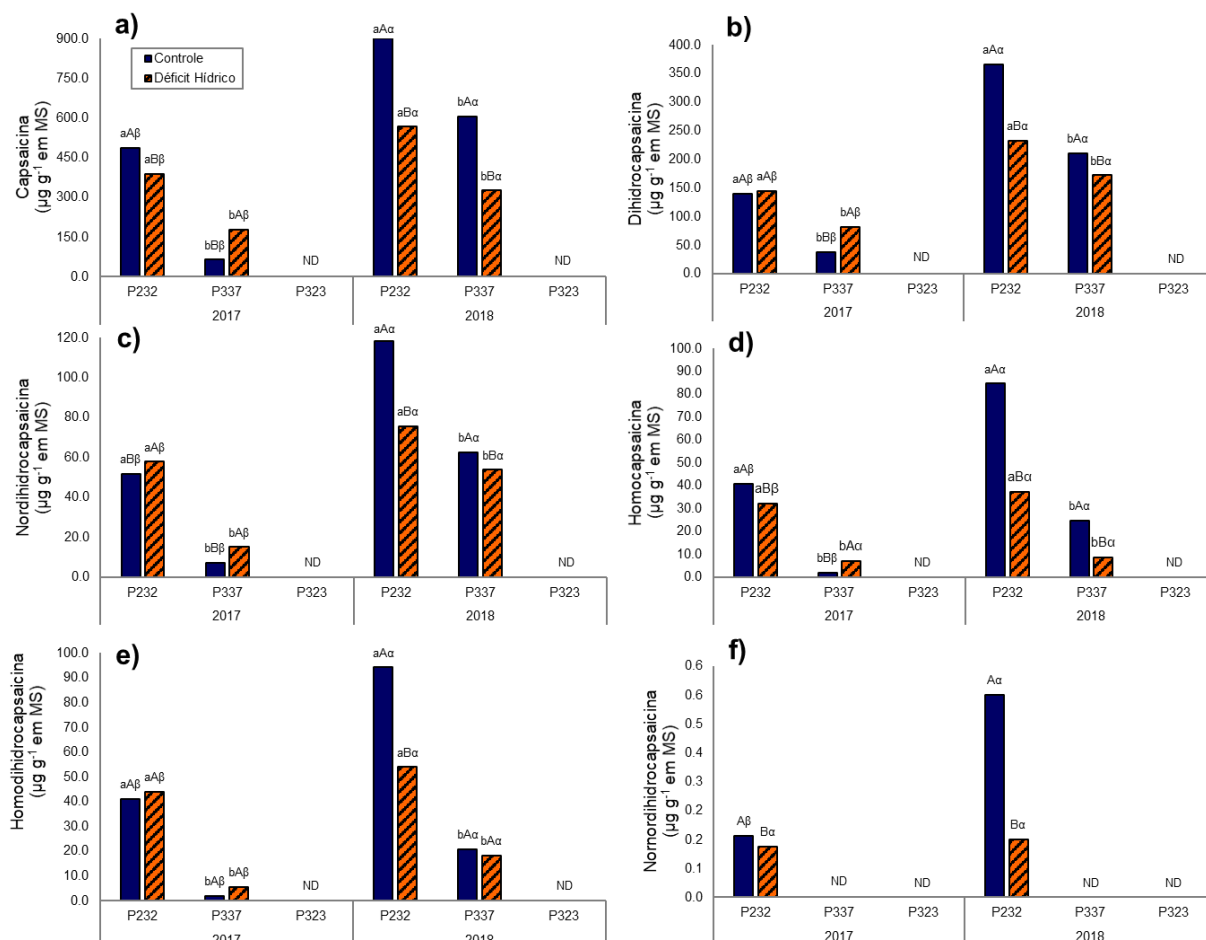


Figura 26. Perfil de compostos capsaicinoides em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P232 genótipo de média pungência; P337 genótipo de baixa pungência; P323 genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MS massa seca; ND Não detectado. Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento e no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes no mesmo ano, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo submetidas ao mesmo tratamento em anos diferentes, acompanhadas por letras gregas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

O déficit hídrico promoveu a redução dos compostos capsaicina, homocapsaicina e nornordihidrocapsaicina no genótipo de média pungência P232 cultivado no ano de 2017 (Figura 26a, 26d e 26f). O aumento dos capsaicinoides sob déficit hídrico ocorreu para o genótipo de baixa pungência P337 apenas no ano de 2017 (Figura 26a; 26b; 26c e 26d). No genótipo de média pungência P232, o déficit hídrico proporcionou aumento do composto nordihidrocapsaicina no ano de 2017 (Figura 26c). Pimentas cultivadas no ano de 2018 apresentaram redução do teor de capsaicinoides sob condições de déficit hídrico em comparação ao tratamento controle, com exceção do genótipo P337 para homodihidrocapsaicina (Figura 26e). Com relação a performance dos genótipos nos dois anos de cultivo, o teor de

capsaicinoides foi maior no ano de 2018 em relação a 2017 (Figura 26a, 26b, 26c, 26d, 26e e 26f). Esses resultados não foram observados nos compostos homocapsaicina para o genótipo de baixa pungência P337 e nornordihidrocapsaicina para o genótipo de média pungência P232, que em condições de déficit hídrico não diferiram entre os anos de cultivo (Figura 26d e 26f).

Foram avaliadas as correlações entre *DREB1A*, *ERF5*, *PUN1* e capsaicinoides totais (CST), nos genótipos P232 (média pungência) e P337 (baixa pungência) considerando tratamento e safra. Quando considerado o tratamento por déficit hídrico x controle, observou-se que o genótipo P232 (média pungência) apresentou correlação negativa entre CST×*PUN1*, CST×*ERF5*, *DREB1A*×*ERF5* na safra de 2017 (Figura 27a). Correlação positiva no genótipo P232 (média pungência) foi observada entre as variáveis CST×*DREB1A* nas duas safras e CST×*PUN1* e *PUN1*×*DREB1A* na safra de 2018 (Figura 27a e 27b). Ainda considerado o tratamento, o genótipo P337 (baixa pungência) apresentou correlação negativa entre as variáveis CST×*DREB1A* e *PUN1*×*DREB1A* na safra de 2017 e CST×*ERF5*, *PUN1*×*ERF5* e *DREB1A*×*ERF5* na safra de 2018 (Figura 27c e 27d). Correlação positiva foi observada entre CST×*PUN1* em ambas as safras no genótipo P337 (baixa pungência) e entre *PUN1*×*ERF5* na safra de 2017 e CST×*DREB1A* na safra de 2018 (Figura 27c e 27d).

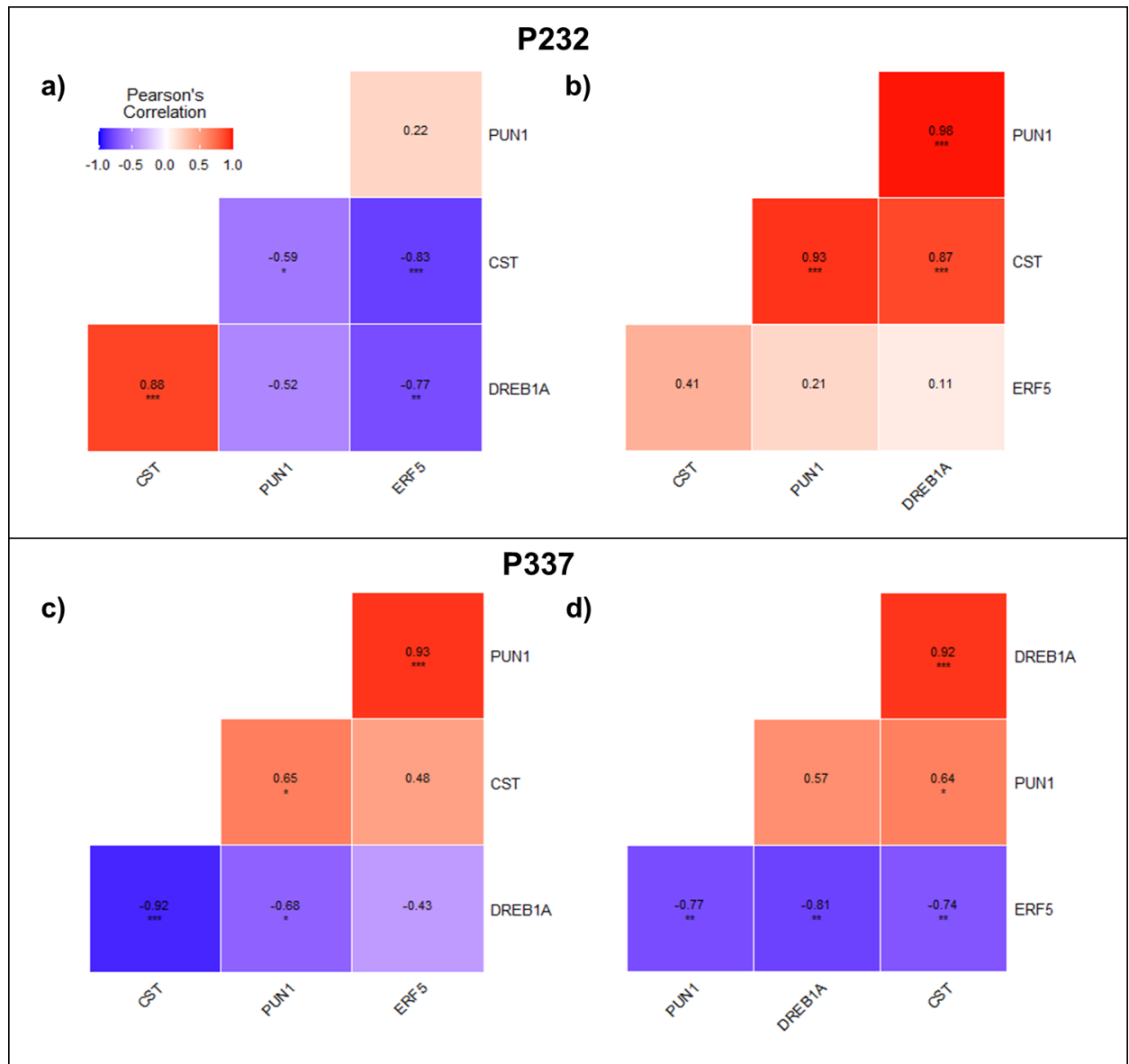


Figura 27. Correlação de Pearson entre *DREB1A*, *ERF5*, *PUN1* e CST para tratamento. a) e c) genótipos no ano 2017. b) e d) genótipos no ano 2018; <sup>P232</sup> genótipo de média pungência; <sup>P337</sup> genótipo de baixa pungência; <sup>CST</sup> capsaicinoides totais; \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; \*\*\* significativo a 0,1%.

Considerando a safra, a correlação entre *DREB1A*, *ERF5*, *PUN1* e CST para os genótipos de média e baixa pungência pode ser observada na figura 28. Houve correlação negativa entre *CST*×*ERF5*, *PUN1*×*ERF5* e *DREB1A*×*ERF5* e correlação positiva entre *CST*×*PUN1* para ambos os genótipos P232 (média pungência) e P337 (baixa pungência) (Figura 28a e 28b). Correlação positiva entre *CST*×*DREB1A* e *PUN1*×*DREB1A* foi observada apenas no genótipo de média pungência P232 (Figura 28a).

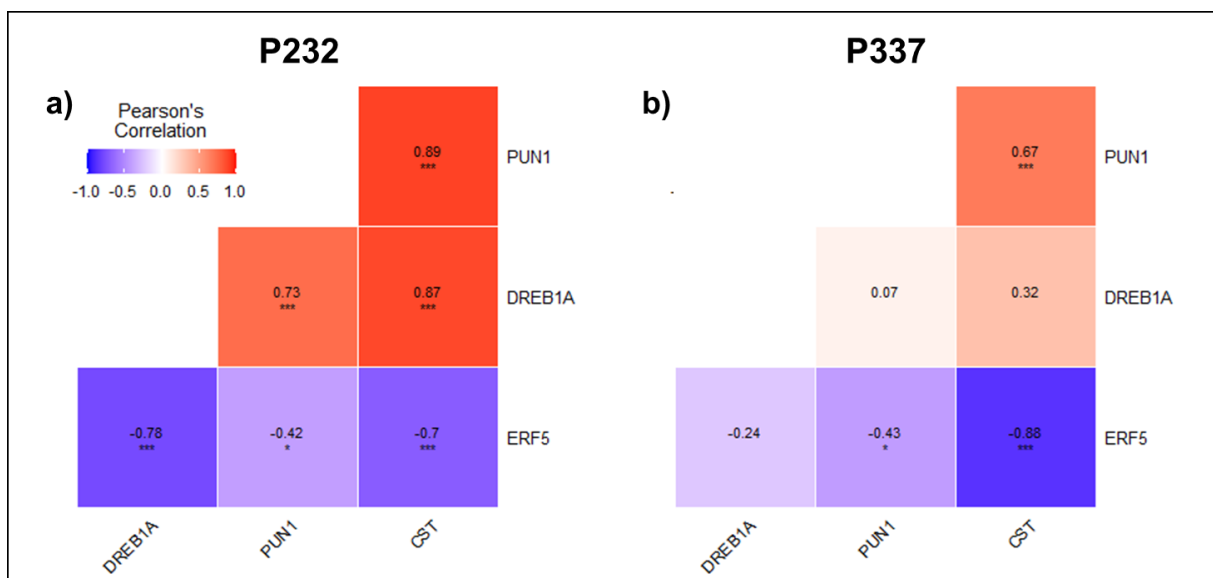


Figura 28. Correlação de Pearson entre *DREB1A*, *ERF5*, *PUN1* e CST para safra. a) genótipo P232. b) genótipo P337. <sup>P232</sup> genótipo de média pungência; <sup>P337</sup> genótipo de baixa pungência; CST capsaicinoides totais; \* significativo a 5%; \*\* significativo a 1%; \*\*\* significativo a 0,1%.

Quatorze compostos foram identificados a partir da avaliação do perfil de aminoácidos, dos quais o composto ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) é um derivado de aminoácido. Entre os aminoácidos identificados, seis pertencem ao grupo dos alifáticos não polares (leucina, glicina, isoleucina, valina, alanina e prolina), cinco dos polares não carregados (treonina, asparagina, glutamina, cisteína e serina) e dois dos carregados negativamente (ácido glutâmico, ácido aspártico) (Figura 29).

Dos aminoácidos e derivados analisados nas pimentas, apenas a leucina não apresentou diferenças significativas entre os fatores avaliados nesse experimento (genótipo  $\times$  condição estressora  $\times$  ano de cultivo). Valores de leucina foram em média de 0,26 mg g<sup>-1</sup> em massa seca.

O déficit hídrico influenciou no acúmulo de aminoácidos nos frutos de pimenta. A restrição hídrica aplicada sobre o genótipo de média pungência P232 promoveu o aumento no teor dos aminoácidos no ano de 2017, exceto para o composto cisteína (Figura 29e). Porém no ano de cultivo seguinte, em 2018, esse resultado foi observado apenas para o composto ácido glutâmico (Figura 29f). Performance semelhante foi observada para o genótipo P337 de baixa pungência, em que o tratamento déficit hídrico promoveu aumento dos aminoácidos isoleucina, treonina, ácido aspártico e asparagina nos dois anos de cultivo (Figura 29b, 29c, 29d e 29g) e para o ácido glutâmico em 2018 (Figura 29f). O genótipo P323 apresentou a performance inversa



aos outros dois genótipos. Estes resultados foram observados principalmente no ano de 2017, em que os aminoácidos treonina, ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e glutamina tiveram seus teores reduzidos nas pimentas do genótipo P323 cultivadas sob déficit hídrico (Figura 29c, 29d, 29f, 29g e 29h).

O ano de cultivo também influenciou diretamente o acúmulo de aminoácidos nas pimentas. Frutos dos genótipos P232 e P337 apresentaram maior teor de aminoácidos em 2017, em comparação aos frutos cultivados em 2018. Esses resultados foram observados principalmente para os aminoácidos glicina, isoleucina, treonina e ácido aspártico (Figura 29a, 29b, 29c e 29d). A asparagina foi o composto mais abundante dentre os aminoácidos identificados nas pimentas (Figura 29g).

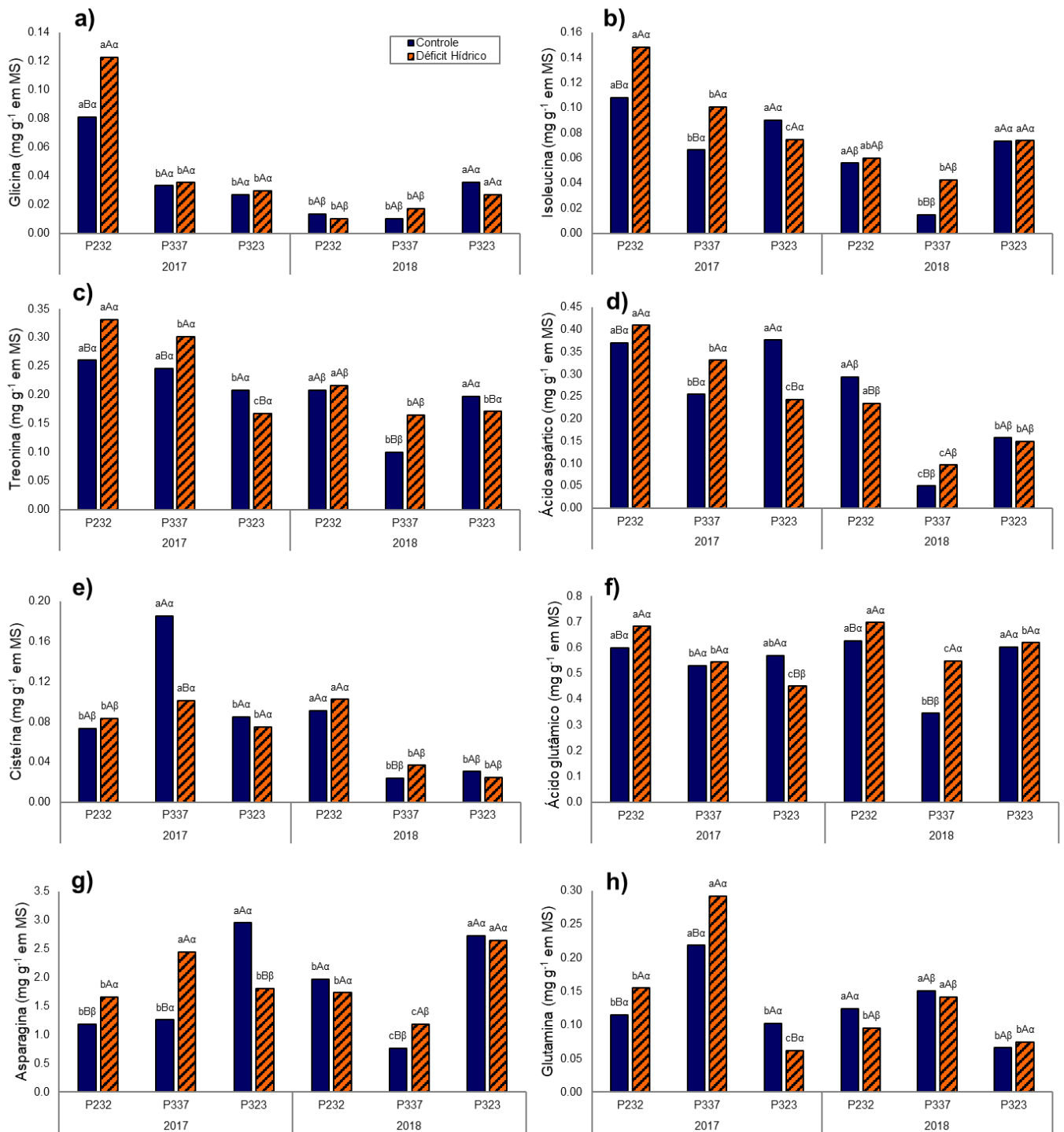


Figura 29. Perfil de aminoácidos em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P<sub>232</sub> genótipo de média pungência; P<sub>337</sub> genótipo de baixa pungência; P<sub>323</sub> genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MS massa seca. Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento e no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes no mesmo ano, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05). Médias do mesmo genótipo submetidas ao mesmo tratamento em anos diferentes, acompanhadas por letras gregas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p≤0,05).

Os compostos valina, alanina, prolina, serina e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (gaba) não apresentaram tripla interação e foram desmembrados em dois fatores, conforme a significância (Figuras 30, 31 e 32). O déficit hídrico promoveu alterações no acúmulo dos aminoácidos e derivados (Figura 30). Um aumento significativo de valina, serina e prolina foi observado para os genótipos P337 (baixa pungência) sob déficit hídrico, independente do ano de cultivo (Figura 30a, 30b e 30c). Pimentas do genótipo de média pungência P232 tiveram ganho no teor de valina, alanina e GABA sob déficit hídrico (Figura 30a, 30d e 30e). O genótipo sem pungência P323, sob déficit hídrico, apresentou redução nos teores dos aminoácidos serina e prolina (Figura 30b e 30c).

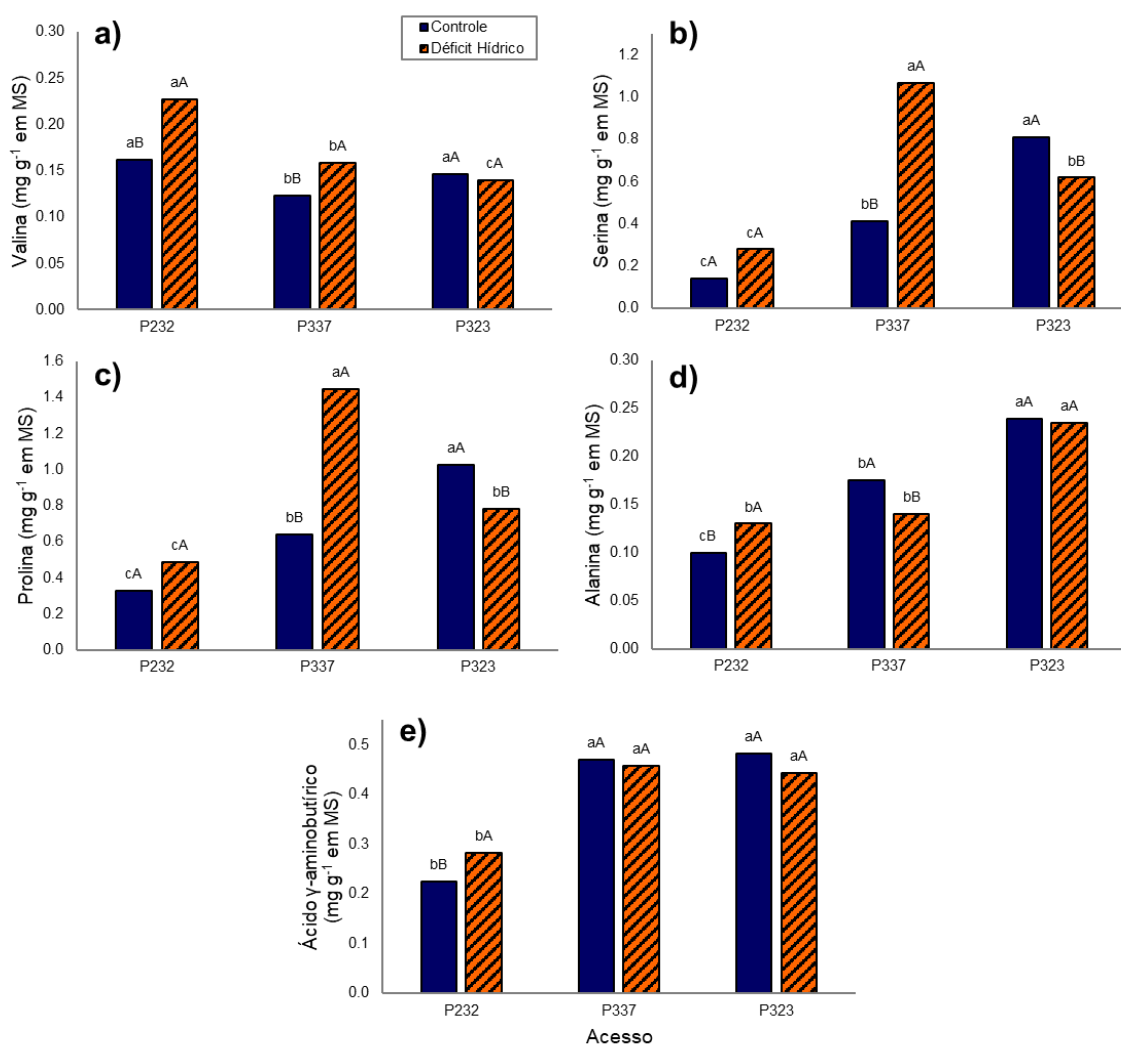


Figura 30. Concentração de aminoácidos e ácido  $\gamma$ -aminobutírico em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P<sub>232</sub> genótipo de média pungência; P<sub>337</sub> genótipo de baixa pungência; P<sub>323</sub> genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MS massa seca. Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Com relação ao aporte hídrico e o ano de cultivo, observou-se nesse estudo que independentemente do genótipo, alanina e GABA tiveram maiores teores no ano de 2017 em relação a 2018 (Figura 31a e 31b). O déficit hídrico proporcionou redução do aminoácido alanina em 2018, quando comparado ao tratamento controle (Figura 31a).

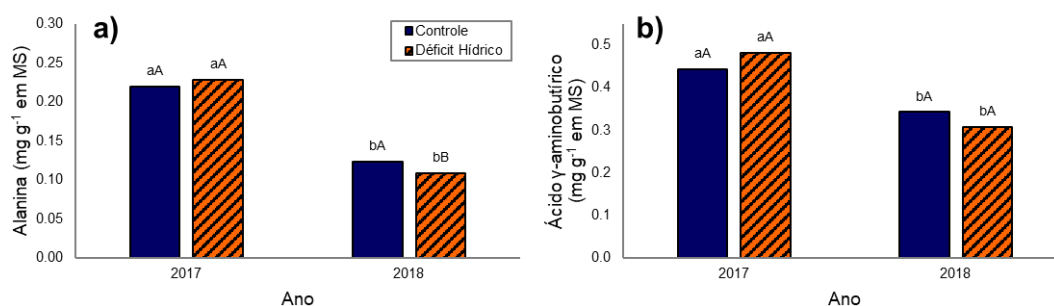


Figura 31. Concentração de alanina e ácido  $\gamma$ -aminobutírico em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; <sup>MS</sup> massa seca. Médias de cada ano submetidas ao mesmo tratamento, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo ano, submetidas a tratamentos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Independente do fornecimento hídrico em que as plantas foram cultivadas, observou-se em 2017 o maior teor dos compostos valina, alanina e GABA em relação a 2018 (Figura 32a, 32b e 32c), com exceção do genótipo P323 (baixa pungência) para o teor de valina (Figura 32a). Os teores de serina e prolina foram significativamente aumentados em 2018 para o genótipo P323, em relação a 2017 (Figura 32d e 32e).

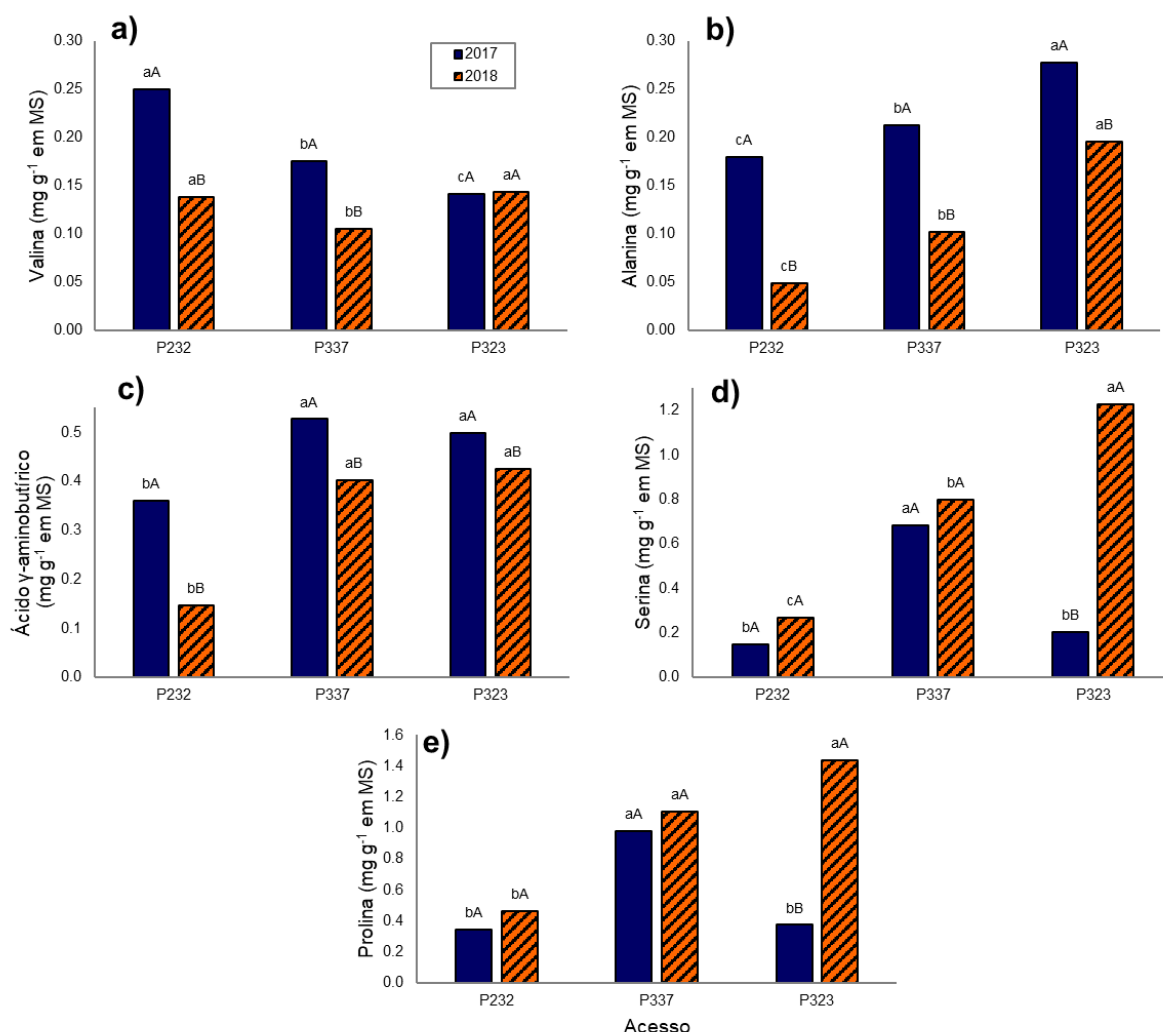


Figura 32. Concentração de aminoácidos e ácido γ-aminobutírico em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P<sub>232</sub> genótipo de média pungência; P<sub>337</sub> genótipo de baixa pungência; P<sub>323</sub> genótipo sem pungência; MS massa seca. Médias de cada genótipo no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo em anos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Dos açúcares presentes nas pimentas sob déficit hídrico em dois anos de cultivo, pode-se identificar sacarose, frutose, glicose, xilose e manitol (Figuras 33, 34 e 35). Os maiores teores médios de açúcares foram observados para frutose e glicose, seguido por sacarose e em menores proporções por manitol e xilose.

O déficit hídrico proporcionou aumento nos teores de manitol no ano de 2018, para os genótipos P232 (média pungência) e P337 (baixa pungência), (Figura 33a). Redução no teor de sacarose foi observada sob cultivo em déficit hídrico para o genótipo P232 no ano de 2017. Performance inversa foi observada para o genótipo P337 nesse mesmo ano (Figura 33b). A sacarose apresentou maiores teores no ano de 2017 em relação a 2018, principalmente para o genótipo P337 (Figura 33b).

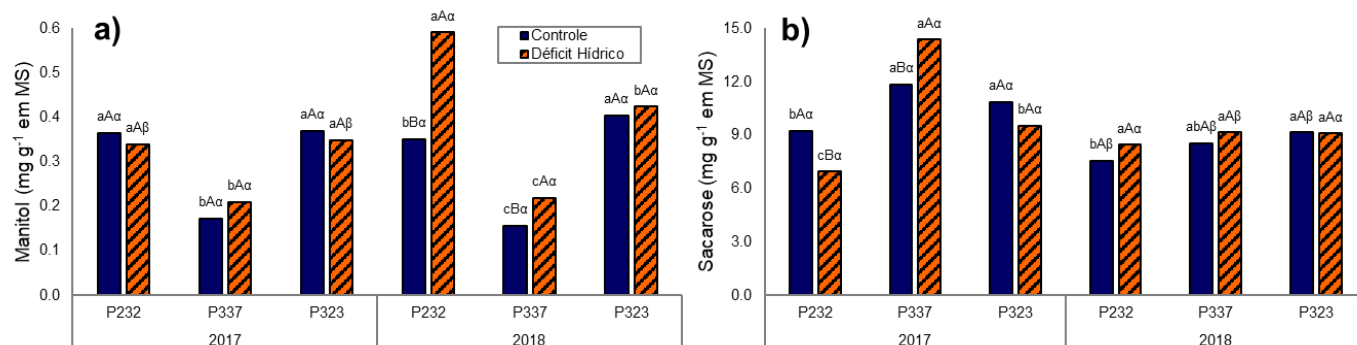


Figura 33. Concentração de manitol e sacarose em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P232 genótipo de média pungência; P337 genótipo de baixa pungência; P323 genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MS massa seca. Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento e no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes no mesmo ano, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo submetidas ao mesmo tratamento em anos diferentes, acompanhadas por letras gregas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Frutos do genótipo de baixa pungência (P337) sob déficit hídrico tiveram maiores teores de glicose e xilose do que frutos controle (Figura 34a e 34b). Para o genótipo de média pungência P232, o teor de xilose reduziu frente a condição de déficit hídrico (Figura 34b).

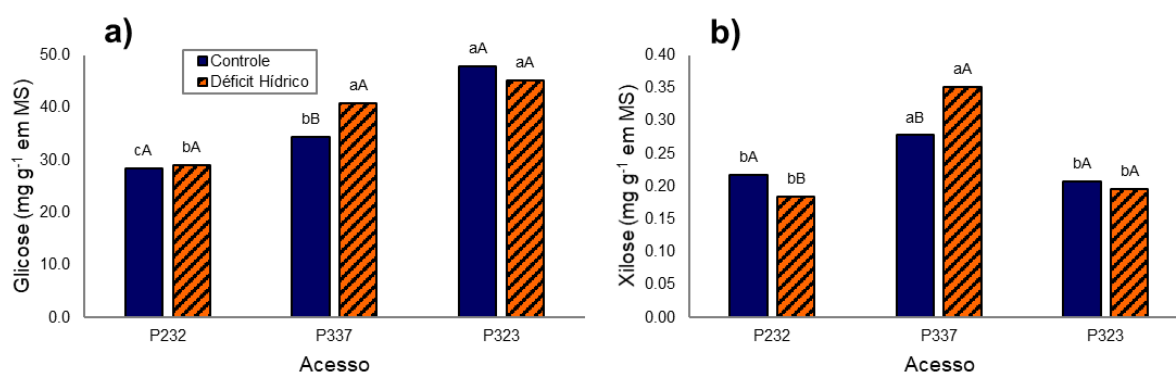


Figura 34. Concentração de glicose e xilose em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P232 genótipo de média pungência; P337 genótipo de baixa pungência; P323 genótipo sem pungência; Controle 500mL de H<sub>2</sub>O diário; Déficit hídrico 500mL de H<sub>2</sub>O em três dias alternados da semana; MS massa seca. Médias de cada genótipo submetidas ao mesmo tratamento, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo, submetidas a tratamentos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Independentemente do tratamento, observou-se um aumento nos teores de glicose, frutose e xilose para genótipo de baixa pungência (P337), no ano de 2018 (Figura 35a, 35b e 35c). O genótipo sem pungência (P323) teve seus níveis de glicose e xilose reduzidos em 2018 com relação ao ano de cultivo anterior (Figura 35a e 35c).

De modo independente do ano de cultivo o déficit hídrico promoveu aumento do teor de glicose e xilose no genótipo P337 (Figura 35a e 35c) e redução de xilose no genótipo de média pungência P232 (Figura 35c).

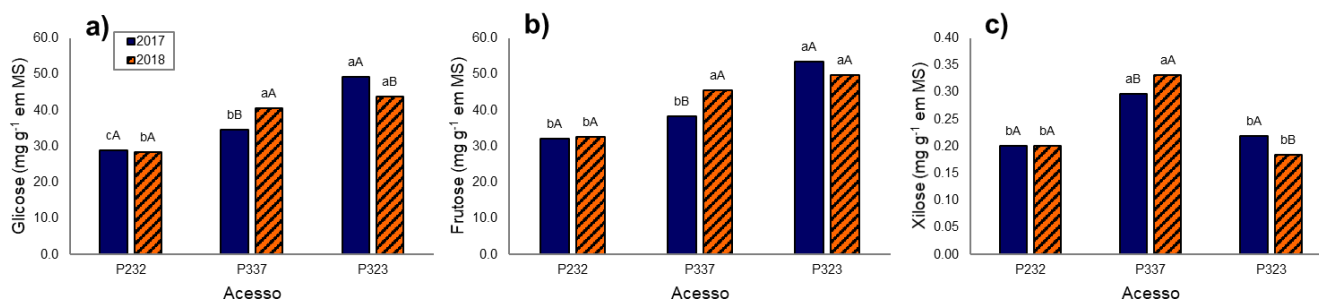


Figura 35. Concentração de glicose, frutose e xilose em pimentas (*Capsicum baccatum*) sob déficit hídrico em dois anos de cultivo. P<sup>232</sup> genótipo de média pungência; P<sup>337</sup> genótipo de baixa pungência; P<sup>323</sup> genótipo sem pungência; MS massa seca. Médias de cada genótipo no mesmo ano, acompanhadas por letras minúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Médias do mesmo genótipo em anos diferentes, acompanhadas por letras maiúsculas iguais, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

#### 6.4 Análise de componentes principais de pimentas cultivadas sob déficit hídrico

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para observar a dispersão dos genótipos de pimentas *C. baccatum* cultivados sob tratamento controle e de déficit hídrico nas safras de 2016/2017 e 2017/2018 (Figuras 36). A influência do tratamento e ano de cultivo foi avaliada através das variáveis correspondentes a atividade enzimática, potencial antioxidante, caracterização físico-química, potencial osmótico, marcadores de condições estressoras e demais metabólitos totais e individuais.

Na PCA, o modelo explicou 56,4% do total da variação entre os componentes principais 1 – 29,4% e 2 – 27% (Figura 36a). O gráfico *biplot* permitiu a observação da dispersão dos genótipos em função da contribuição das variáveis (Figura 36b). É possível observar que o efeito da safra causou maior discriminação entre os grupos dos genótipos quando comparado ao efeito do tratamento da irrigação (Figura 36a). Para a plotagem os genótipos da safra de 2017 à esquerda do gráfico houve maior influência do perfil de aminoácidos e atividade das enzimas do sistema antioxidante. Na safra de 2018, à direita do gráfico, podemos observar a influência do perfil de



Os genótipos P323 (sem pungência) e P337 (baixa pungência) cultivados em 2017 localizaram-se na parte esquerda do gráfico devido principalmente a contribuição das variáveis potencial osmótico da folha (POF), catalase (CAT),



ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e alanina (ALA). As variáveis sacarose (SAC) e GABA contribuíram principalmente para plotagem de P323 sob déficit hídrico em 2017 (Figura 36b). A plotagem do genótipo de baixa pungência P337 cultivado em 2018 apresentou a contribuição principalmente das variáveis prolina do fruto (PROFR) e CAROT. Prolina (PRO), prolina do fruto (PROFR) e ácido abscísico (ABA) contribuíram principalmente para a plotagem do genótipo P323 no ano de 2018 (Figura 36b).

## 7 Discussão

### 7.1 Parâmetros de rendimento e maturação dos frutos cultivados sob déficit hídrico

O tratamento por déficit hídrico levou a redução significativa da massa fresca dos frutos dos genótipos de pimenta com baixa pungência e sem pungência (Figura 8a). A redução da massa fresca dos frutos do genótipo de média pungência (P232) promovidas pelo déficit hídrico não foram significativas demonstrando que esse genótipo conseguiu uma maior retenção de água e manutenção no desenvolvimento dos frutos durante a condição de estresse (Figura 8a). Esse fato pode estar associado as características bioquímicas da planta, mas também ao fato desse genótipo ter os menores frutos. Em estudos realizados em tomate os autores constataram que quanto menores são as perdas de massa das plantas, melhor sua capacidade em tolerar a perda de água (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010). Delfine *et al.* (2002) observaram que o cultivo de pimentões (*C. annuum*) em condições de sequeiro reduziu significativamente a rendimento e qualidade comercial dos frutos em comparação a plantas irrigadas.

A safra também afetou o rendimento das pimentas, sendo que no ano de 2018 os três genótipos apresentaram redução significativa (maior que 35%) em relação à safra anterior. Mesmo tendo sido semeadas no mesmo período em relação à safra de 2017, as plantas da safra de 2018 tiveram seu desenvolvimento atrasado em virtude das condições ambientais. As médias de temperatura mais baixa em 2018 no período de desenvolvimento dos frutos podem ter afetado o rendimento de massa fresca (Tabela 2).

O déficit hídrico promoveu aumento do acúmulo de sólidos solúveis dos frutos dos três genótipos, no entanto essa resposta foi dependente da safra (Figura 10a). Para Lannes *et al.* (2007), o acúmulo de sólidos solúveis em pimentas *C. chinense* foi positivamente correlacionado com o teor de matéria seca do fruto. Para esses autores, a cada 1% de ganho no peso seco dos frutos, 0,28% correspondem a aumento do teor de sólidos solúveis. Em outro estudo, o ganho de sólidos solúveis em frutos utilizados para a produção de colorau/páprica foi associado à redução do custo da produção pela menor proporção de água a ser removida na secagem (Klieber, 2001).

O déficit hídrico não promoveu alteração nos valores de pH e acidez total nos frutos de *Capsicum baccatum*, mas ambos variaram em função da safra (Figura 9). Esses valores estão em conformidade com os dados observados em estudo anterior, no qual os autores encontraram variações de pH entre 5,2 e 6,5 para pimentas brasileiras da coleção da Embrapa Clima Temperado (Acunha *et al.*, 2017). O genótipo de baixa pungência P337 apresentou em 2018 um valor de acidez total 4,7 vezes superior que na safra de 2017. No entanto, o acúmulo de ácido nesse genótipo não alterou proporcionalmente o pH dos seus frutos. Isso ocorreu provavelmente devido a capacidade tampão encontradas em alguns frutos, fator que possibilita estabilidade do pH mesmo quando há aumento da concentração de ácidos orgânico e consequente alteração da acidez (Powers e Shinholser, 1979; Acunha *et al.*, 2017).

## **7.2 Ajuste osmótico e metabólitos de osmoproteção em plantas cultivadas sob déficit hídrico**

A concentração de glicina-betaína não foi afetada drasticamente nas folhas de pimentas sob déficit hídrico nos dois anos de cultivo (Figura 14). Da mesma maneira, o tratamento não afetou o conteúdo de glicina-betaína nos frutos (dados não mostrados). Esses resultados indicam que plantas de *Capsicum* não utilizam glicina-betaína na defesa a seca. Embora a glicina-betaína seja um importante ajustador osmótico, algumas espécies de plantas como *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* não são produtoras naturais de glicina-betaína (Rhodes e Hanson, 1993).

Um estudo avaliando o teor de glicina-betaína em plantas de pimenta, em cinco momentos, entre 7 e 21 dias de déficit hídrico, observou flutuações nos valores desse composto, porém os resultados não foram alterados significativamente (Escalante-Magaña *et al.*, 2019). Esses resultados corroboram que plantas de *Capsicum* não aumentam os teores de glicina-betaína como metabólito de defesa em condições de seca. Estudos anteriores têm evidenciado os benefícios da aplicação exógena de glicina-betaína em culturas de tomate e pimenta na tolerância ao frio, seca e salinidade (Mäkelä *et al.*, 1998; Mäkelä *et al.*, 2000; Park *et al.* 2006; Korkmaz *et al.*, 2012; Rezaei *et al.*, 2012; Karabudak *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2016), mostrando que esse composto

apesar de não ser naturalmente acumulado nessa Solanaceae é uma alternativa efetiva para tolerância.

Inesperadamente, o teor de prolina nas folhas de pimentas sob déficit hídrico foi afetado apenas no ano de 2018 (Figura 15a). Embora a disponibilidade de água tenha sido a mesma entre as duas safras, as condições ambientais foram divergentes, com menores médias térmicas na safra de 2018 (Tabela 2). Sob déficit hídrico, os níveis de prolina das folhas dos genótipos P232 (média pungência) e P337 (baixa pungência) e dos frutos do genótipo P337 foram maiores que seus respectivos controles na safra de 2018 (Figura 15a e 15b). Esses resultados demonstram que embora os fatores como ano de cultivo e déficit hídrico sejam importantes no acúmulo de prolina, cada genótipo estudado apresentou performance diferente frente as alterações de ambiente. Autores observaram que o aumento do teor prolina ocorre em folhas de tomateiro cereja apenas para as cultivares sensíveis, enquanto que a cultivar tolerante não acumulou prolina durante o déficit hídrico moderado (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010). As diferentes características dentre os anos de cultivo, associadas ao déficit hídrico aplicado nas pimentas pode ter induzido redução do teor de prolina, mas a sensibilidade à condição estressora no ano de 2018 foi observada principalmente para o genótipo com baixa pungência (P337).

Estudos anteriores demonstraram que o conteúdo de prolina em plantas de *Capsicum* sob déficit hídrico tiveram seus teores aumentados a partir do décimo quarto dia na condição de estresse constante (Escalante-Magaña *et al.*, 2019). O presente estudo quantificou o acúmulo de prolina sob estresse intermitente de 28 dias. Possivelmente o fornecimento de água na mesma proporção de plantas controle em determinados períodos durante o estresse pode ter afetado o acúmulo progressivo de prolina nas folhas e frutos. Inesperadamente folhas do genótipo sem pungência P323 sob déficit hídrico apresentaram menor teor de prolina em relação ao controle na safra de 2018 (Figura 15a).

O aumento da concentração de solutos, observada através da redução do potencial osmótico, ocorreu em folhas de plantas sob déficit hídrico (Figura 15c). Os resultados demonstram que em ambos os tratamentos, controle e déficit hídrico, houve maior acúmulo de solutos nas folhas de plantas cultivadas em 2018. O ajustamento osmótico pelo acúmulo de solutos mantém o turgor celular, permitindo a abertura estomática e a atividade fotossintética, que mesmo reduzidas ainda

possibilitam a distribuição de carbono e nitrogênio pela planta (Bartels e Sunkar, 2005). Diferentes fatores relacionados ao ano de 2018 podem ter favorecido o acúmulo de prolina, e possivelmente também de outros solutos osmoticamente ativos. Esses osmorreguladores também contribuem na eliminação de espécies reativas de oxigênio, combatendo danos oxidativos contra as células vegetais (Sharma *et al.*, 2018).

Aminoácidos são compostos importantes por constituírem proteínas e serem precursores de vários metabólitos especializados (Pratelli e Pilot, 2014). Com a condição de déficit hídrico houve aumento no teor de aminoácidos livres de maneira dependente do genótipo e ano de cultivo, como pode ser observado para P232 (média pungência) e P337 (baixa pungência) (Figuras 29 e 30). Isoleucina, treonina, ácido aspártico, asparagina, valina, serina e prolina aumentaram durante do déficit hídrico em ambos os anos no genótipo de baixa pungência P337 (Figura 29 e 30).

O genótipo sem pungência P323 não apresentou aumento da concentração de aminoácidos livres em função da restrição hídrica. Adicionalmente, os aminoácidos treonina, ácido aspártico, asparagina, glutamina, serina e prolina tiveram seu conteúdo reduzido no genótipo P323 durante o déficit hídrico, principalmente no ano de 2017 (Figura 29). Aminoácidos são uma classe de compostos capaz de atuar em diversos processos fisiológicos como osmoproteção, transporte de íons e controle estomático, na regulação gênica e síntese de algumas enzimas (Rai, 2002), tendo um papel importante como mecanismo de tolerância em condições estressoras.

O genótipo de baixa pungência P337 foi o principal genótipo que apresentou acúmulo de açúcares nos frutos, causado em função do déficit hídrico. Durante condições de estresse abiótico, como por exemplo a seca, é possível observar o aumento do conteúdo de açúcares solúveis. Esses compostos tem a propriedade em atuar na manutenção da homeostase e também auxiliam na eliminação de espécies reativas de oxigênio (Sharma *et al.*, 2019). Foi possível observar incremento de glicose e xilose durante o déficit hídrico, independente do ano de cultivo (Figura 34) e aumento no teor de sacarose no ano de 2017 e manitol em 2018 em função do déficit hídrico no genótipo de baixa pungência P337 (Figura 33). O aumento no teor de frutose, glicose, sacarose e/ou outros açúcares é um efeito conhecido nas plantas em condições de estresse osmótico (Bolarin *et al.*, 2001; Martínez-Ballesta *et al.*, 2004; Sziderics *et al.*, 2010; Mibei *et al.*, 2018). Glicose, frutose e xilose foram alteradas

também em função do ano no genótipo P337, sendo maiores em fruto de plantas cultivadas em 2018. O acúmulo de açúcares em função do déficit hídrico no genótipo de baixa pungência P337 pode evidenciar sua capacidade em ativar mecanismos de defesa em função das condições estressoras, através do acúmulo de metabólitos primários, o que pode ser indicativo de maior sensibilidade ao estresse e necessidade de osmoproteção.

Embora o genótipo de média pungência P232 não tenha sido o genótipo que acumulou a maior variedade de aminoácidos e açúcares, a presença dos compostos ácido aspártico, treonina, valina, glicina e manitol foram importantes para a distinção desse genótipo em comparação com P337 e P323, como observado na análise de componentes principais (Figura 36). Esses compostos aliados a presença de ácidos fenólicos e capsaicinoides que também auxiliaram na distinção do genótipo, podem ter auxiliado a manutenção em condições estressoras e consequente melhor tolerância pela planta. Considerando esses metabólitos e o fato desse genótipo não ter apresentado significativas perdas de massa fresca dos frutos sob déficit hídrico, indicando de sua melhor tolerância a essa condição estressora.

### **7.3 Regulação da biossíntese de capsaicinoides e da transcrição de genes associados ao déficit hídrico**

Capsaicinoides são compostos amplamente avaliados em pimentas do gênero *Capsicum* por serem responsáveis pela pungência do fruto. Os genótipos selecionados para o estudo apresentavam naturalmente níveis distintos de pungência (Tabela 1). Na síntese dos capsaicinoides, a atividade da enzima capsaicina sintase decorrente da expressão do gene *PUN1*, liga o composto vanililamina com um ácido graxo de cadeia ramificada (Arce-Rodríguez & Ochoa-Alejo, 2019). Capsaicina sintase é uma enzima acyl-transferase, sendo a última enzima da rota biossintética, está envolvida na formação dos capsaicinoides propriamente ditos. Mesmo que não tenha sido detectada a presença de compostos capsaicinoides para o genótipo P323 (Figura 26), foi possível observar a expressão do gene *PUN1* a partir da quantificação relativa de transcritos (Figura 11c). Esses resultados sugerem que a ausência dos capsaicinoides em pimentas *Capsicum* é decorrente da ausência de substrato ou da alteração na estrutura da capsaicina sintase e não da ausência de expressão do gene

codificador dessa enzima. Embora muitos genótipos não pungentes tenham apresentado um alelo de *PUN1* que contém uma deleção com perda de função no promotor e no primeiro éxon da região de codificação (Stewart *et al.*, 2005), cultivares não pungentes CH-19 Sweet e Himo (*C. annuum*) foram descritas como tendo uma mutação no gene que codifica a enzima aminotransferase predita (p-AMT) (Lang *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2010). Sem a atividade da AMT, não ocorre a formação do composto aromático vanililamina, e a rota seria desviada para a formação de capsinoides, compostos não pungentes estruturalmente semelhantes aos capsaicinoides. Mais recentemente autores descobriram que a interrupção da expressão do gene *putative ketoacyl-ACP reductase* (*CaKR1*) induz perda de pungência em *Capsicum*, demonstrando que esse gene também pode estar envolvido na biossíntese de capsaicinoides (Koeda *et al.*, 2019). Esses estudos demonstram a complexa rede de genes envolvidos na síntese de capsaicinoides em pimentas.

Assim como observado na quantificação relativa de transcritos do gene *PUN1*, déficit hídrico e ano de cultivo afetaram o acúmulo de capsaicinoides. Era esperado, a partir dos dados de transcritos, que ambos os genótipos de média pungência e baixa pungência (P232 e P337) apresentassem aumento do teor de capsaicinoides sob déficit hídrico no ano de 2017 e redução em 2018, sob a mesma condição. Embora ambos os genótipos, de média pungência e baixa pungência, tiveram seus teores de capsaicinoides reduzidos sob condição de déficit hídrico no ano de 2018, apenas o genótipo P337 teve seu conteúdo aumentado no ano de cultivo de 2017. Mesmo que a relação de transcritos do gene *PUN1* tenha aumentado no ano de 2017 sob déficit hídrico, o genótipo P232 (média pungência) não apresentou acúmulo de capsaicinoides, demonstrando uma correlação negativa entre essas variáveis (Figura 27a). Assim, é possível que outros genes além de *PUN1* e/ou fatores pós-transcricionais possam estar associados as características de maior pungência nesse genótipo. Um estudo anterior demonstrou que a cultivar de pimenta KKU-P-11003 (*C. annuum*) manteve o conteúdo de capsaicinoides total estável em diferentes ambientes, já a cultivar Dallay khorsaney (*C. chinense*) se mostrou sensível a mudanças ambientais para o mesmo parâmetro (Gurung *et al.*, 2012). Esses resultados sugerem que embora a interação genótipo-ambiente afete o acúmulo de capsaicinoides em pimentas, o genótipo é o principal fator em relação ao efeito do

ambiente (Gurung *et al.*, 2011). E ainda, indica a possível participação de outros genes na síntese desses compostos, como o *AMT* e *CaKR1*.

A relação entre o acúmulo de transcritos de *PUN1* pareceu afetar o teor dos capsaicinoides (Figuras 11c, 12c, 26, 27 e 28). Os frutos do genótipo de média pungência P232 cultivado sob déficit hídrico em 2018 apresentaram expressão relativa de *PUN1* 0,2% menor em relação ao controle (Figura 11c). O teor de capsaicinoides total nos frutos desse mesmo genótipo reduziu 38% ( $595,4 \mu\text{g g}^{-1}$ ) sob déficit hídrico em comparação a frutos do mesmo genótipo cultivado sob condições ideais de fornecimento de água (controle) e uma correlação positiva foi observada entre  $\text{CST} \times \text{PUN1}$  (Figura 27b). O genótipo de baixa pungência P337, que reduziu 0,6% na expressão relativa de transcritos de *PUN1* sob déficit hídrico em comparação ao controle, teve decréscimo de 37% ( $344,9 \mu\text{g g}^{-1}$ ) no teor de capsaicinoide total, demonstrando que a alteração no acúmulo de transcritos de *PUN1* sob déficit hídrico afetou diretamente o acúmulo de capsaicinoides em 2018.

As condições relacionadas a safra também proporcionaram alterações da biossíntese de capsaicinoides (Figuras 12c e 26). Tais características pareceram afetar principalmente o tratamento controle, que aumentou mais de cinco vezes a expressão relativa do gene *PUN1*, de acordo com cada genótipo (Figura 12c). Da mesma maneira, o teor de capsaicinoides total em 2018 no tratamento controle aumentou 51% ( $801,9 \mu\text{g g}^{-1}$ ) no genótipo de média pungência P232 e 88% ( $809,6 \mu\text{g g}^{-1}$ ) no genótipo de baixa pungência P337 quando comparados a 2017, já em déficit hídrico esse acúmulo foi igual 31% e 50% para os respectivos genótipos de média pungência e baixa pungência. Observou-se para as safras uma correlação positiva entre as variáveis  $\text{CST} \times \text{PUN1}$  nos dois genótipos, indicando que as alterações entre os anos afetaram proporcionalmente os genótipos independente do tratamento (Figura 28).

Estudos realizados em cultivares com níveis contrastantes de pungência, demonstrou que o déficit hídrico induziu aumento de capsaicinoides, exceto nas culturas de alta pungência e que essas apresentam menor flutuação nos teores de capsaicinoides (Phimchan *et al.*, 2012; Phimchan *et al.*, 2014). Contrariamente, Kopta *et al.* (2020) observaram que as cultivares de baixa e média pungência não foram significativamente afetadas pelas condições de déficit hídrico, enquanto que a cultivar de alta pungência apresentou um aumento significativo sob essa condição. No



presente estudo embora ambos os genótipos, de média pungência (P232) e baixa pungência (P337), tenham mudado sua performance em função do déficit hídrico e ano de cultivo, as maiores flutuações observadas foram para o genótipo de baixa pungência (P337). Embora a performance do genótipo P337 tenha sido inconstante entre as safras, aumentando sob déficit hídrico em 2017 e reduzindo em 2018 a correlação entre o acúmulo de transcritos e de capsaicinoides foi diretamente proporcional (Figura 27c e 27d).

A região promotora do gene *PUN1* apresenta vários elementos *cis* alvos de ligação de fatores de transcrição que atuam na via dependente de ABA, e apenas um elemento *cis* alvo de ligação do fator DREB (sinalização independente de ABA) (Figura 13). Esse resultado sugere que esse gene pode ser controlado pelo ABA, entretanto o acúmulo de ABA não foi observado em associação a condição de estresse nos frutos, com isso, a ativação desse gene ocorre por pequenas concentrações de ABA e/ou outros mecanismos de sinalização. Yu *et al.* (2019) relataram que a maior tolerância a seca em tomateiros tratados com trealose ocorreu devido ao aumento da sinalização de genes relacionados a ABA e não o acúmulo de ABA, resultado ao qual desvincula o aumento do teor do metabolismo de ABA com sua efetiva sinalização. Embora fosse esperado o acúmulo de ABA em função do déficit hídrico, o mesmo não foi observado nos frutos.

O ácido abscísico é um importante fito-hormônio vegetal responsável por muitas funções nas plantas em homeostase e atua também como importante sinalizador em vários genes durante condições estressoras (Yu *et al.*, 2019). Além disso, o ABA tem sido explorado como um importante sinalizador durante o amadurecimento em frutos de tomate (Sun *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2017). O teor de ABA nos frutos aumentou apenas no genótipo sem pungência P323 em 2018 (Figura 23a). O ácido faseico, metabólito do catabolismo de ABA, apresentou redução do teor nos frutos de pimentas cultivadas em condições de déficit hídrico (Figura 23b).

No presente estudo, EGABA aumentou em praticamente em todos os genótipos diante do déficit hídrico (Figura 23b). Éster glicosilado de ácido abscísico é uma forma de armazenamento e transporte e é facilmente convertido à ABA pela enzima  $\beta$ -glicosidase, ativada por estresse (Lee *et al.*, 2006). A conversão de ABA em EGABA sugere que diante de condições estressoras o ABA é catabolizado para o transporte para órgãos onde poderá efetivamente regular o controle estomático e a

transpiração. O teor de ABA nas folhas de pimenta não foi investigado no presente estudo.

O gene *ERF5* apresentou elementos regulatórios de ação *cis* associados aos fatores de transcrição AREB, MYB e WRKY, dependentes de ABA (Figura 13). Considerando a presença de ERAC dependente de ABA, é possível constatar que *ERF5* em pimentas pode ser regulado por duas vias de sinalização diferentes, dependentes de ABA e de etileno. Pan *et al.* (2012) estudaram a expressão do gene *SIERF5* em tomate (*Solanum lycopersicum*) na presença dos hormônios ABA, ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno, e observaram que o acúmulo de transcritos foi induzido por ABA e etileno. Tais relatos corroboram que genes membros da família *ERF* podem ser regulados pela via de sinalização de ABA e não somente do etileno.

O aumento da transcrição do gene *ERF5* nas pimentas foi induzida pelo déficit hídrico apenas na safra de 2017 (Figura 11). Muitos estudos têm evidenciado a importância de proteínas ERF na tolerância de condições adversas como resposta a fatores abióticos e bióticos (Chuang *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2012; Klay *et al.*, 2014). Em 2018, apenas o genótipo P337 (baixa pungência) apresentou acúmulo de transcritos de *ERF5* sob o déficit hídrico, sugerindo que esse genótipo manteve a capacidade de indução de genes de tolerância a seca independente da safra. Possivelmente esse genótipo seja mais sensível as alterações ambientais, fator que favorece a manutenção da expressão de genes sabidamente envolvidos na tolerância.

Proteínas ERF são fatores de transcrição com afinidade à caixa GCC na região promotora de genes responsivos ao etileno, e que também se ligam ao motivo DRE/CTR na região promotora de genes responsivos ao estresse osmótico (Lee *et al.*, 2004). A presença de DRE, alvos proteínas ERF nos promotores dos genes *DREB1A* e *PUN1* indica que a expressão desses genes pode ser regulada pelo gene *ERF5* em pimentas *C. baccatum*. Keyhaninejad *et al.* (2014) que avaliaram fatores de transcrição para candidatos no controle da expressão de genes da pungência em tecido placentário de pimentas (*Capsicum* spp.), observaram correlação positiva para dois genes *ERF*. No presente estudo, não foi observada performance consistente entre o acúmulo de transcritos de *ERF5* com *PUN1* e teor de capsaicinoides totais (Figuras 11, 12, 26, 27), o mesmo pode ser observado entre *ERF5*×*DREB1A* (Figuras 11, 12, 27 e 28).

Dois tipos de DRE foram observados na região promotora do gene *DREB1A* (Figura 13), sugerindo que esse gene pode ser autorregulado. A expressão de genes *DREB* leva a formação de uma proteína com afinidade específica a um elemento responsivo DRE (Hong e Kim *et al.*, 2005). Muitos genes de resposta às condições de estresse osmótico apresentam o motivo DRE conservado em seus promotores, o que resulta no aumento da expressão desses genes e acúmulo de metabólitos osmoprotetores. Embora o déficit hídrico não tenha induzido acúmulo de transcritos de *DREB1A* nos frutos de *C. baccatum* (Figura 11a), é possível que a diferença ambiental em 2018 tenha influenciado o aumento da expressão desse gene para dois tratamentos (Figura 12a). Estudos anteriores demonstraram que a superexpressão de genes *DREB* resultou na melhora da tolerância a condições estressoras e também no acúmulo de osmoprotetores como a prolina (Ito *et al.*, 2006). Considerando essa informação, observou-se o acúmulo de prolina em frutos oriundos da safra de 2018 comparada a 2017 (Figura 15b). Embora a expressão de *DREB1A* possa ocorrer em resposta de alterações ambientais nos frutos de pimenta, como observado em função do ano de cultivo, esse gene não parece estar envolvido na sinalização de tolerância a seca.

#### **7.4 Atividade de enzimas antioxidantes nos frutos cultivados sob déficit hídrico**

O déficit hídrico pareceu reduzir a atividade das enzimas SOD, CAT e APX em relação ao tratamento controle nos frutos de *C. baccatum* após quatro semanas nessa condição (Figuras 16 e 17), principalmente no ano de cultivo de 2017. Em 2018 houve A peroxidação lipídica foi maior em 2018 do que em 2017, principalmente no tratamento controle e coincidentemente, a atividade das enzimas SOD, CAT e APX foi menor em 2018 em comparação como o ano de 2017, não havendo diferenças significativas entre tratamentos (Figura 17d). Cultivares de tomate cereja mais sensíveis ao déficit hídrico não tiveram a atividade de CAT e APX alterada sob condição de estresse moderado (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010). Em outro estudo, a atividade da enzima SOD teve um incremento seguido por drástica redução, enquanto a atividade enzima CAT diminuiu durante o déficit hídrico em tomate, resultando em aumentos dos níveis de MDA (Tahi *et al.*, 2008). Os resultados desses estudos demonstram que há uma variação nas respostas das enzimas frente ao déficit

hídrico, como verificado no presente estudo. Isso indica que não necessariamente ocorrerá um incremento da atividade das enzimas antioxidante frente a condição de estresse. A atividade enzimática irá depender da intensidade e período de permanência do estresse, mas também das características do genótipo.

Em um estudo anterior, Anjum *et al.* (2012) avaliaram a performance das enzimas antioxidantes em folhas em duas cultivares de pimentas pungentes (*C. annuum*) ao longo de 28 dias sob três níveis de déficit hídrico. No estudo, os autores observaram que as atividades enzimáticas aumentaram significativamente, com ápice entre 12 e 18 dias após a imposição do déficit hídrico e depois diminuíram acentuadamente atingindo valores inferior ao tratamento controle (Anjum *et al.*, 2012). Possivelmente o mesmo possa ter ocorrido nesse experimento, que após os 28 dias em condição de déficit hídrico as plantas não tenham conseguido manter os níveis de atividade das enzimas protetoras nos frutos.

O ano de cultivo influenciou significativamente a atividade das enzimas do sistema antioxidante, bem como a concentração de peróxido de hidrogênio e malondialdeído. Independentemente do tratamento, SOD e APX tiveram suas maiores atividades no ano de 2017 para todos os genótipos (Figura 18a e 18b). O genótipo de média pungência P232 apresentou maior teor de peróxido de hidrogênio em 2018 o que coincidiu com a maior peroxidação lipídica nesse genótipo, observada pelo maior acúmulo de MDA (Figura 18d e 18e). Foi sugerido que elevados índices de peróxido de hidrogênio nas células causam danos a membranas levando a peroxidação lipídica que pode ser observada pelo aumento de MDA (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2010).

## **7.5 Potencial antioxidante e teor de metabólitos em frutos cultivados sob déficit hídrico**

Observou-se maior capacidade antioxidante na captura do radical ABTS em comparação ao radical DPPH (Figura 19 e 20). Condições associadas à safra de 2018 pareceram influenciar a redução da atividade antioxidante dos genótipos (Figura 19). Relatos sugerem que a capacidade antioxidante dos frutos de *Capsicum* spp. parece estar relacionada principalmente com compostos capsaicinoides e ácido ascórbico e secundariamente com compostos fenólicos (Kopta *et al.*, 2020). No presente estudo

avaliou-se as três classes de compostos e não foi observada a mesma performance de inibição dos radicais com os compostos citados, principalmente porque o teor de compostos capsaicinoides foi superior no ano de 2018, mas reduziu em função déficit hídrico. O genótipo sem pungência (P323) também apresentou capacidade antioxidante, que para inibição do radical DPPH foi igual ou superior aos demais genótipos (Figura 20b).

No presente estudo também avaliou-se o teor de carotenoides totais. Diferenças significativas no teor de carotenoides em função do tratamento foram observadas (Figura 21a). No genótipo de baixa pungência P337 o déficit hídrico causou aumento do teor de carotenoides, enquanto a redução foi observada para os genótipos P232 (média pungência) e P323 (sem pungência). Assim como observado no presente trabalho, um estudo com tomates cereja cultivados sob restrição de água demonstrou que as respostas à seca variaram em função do genótipo (Coyago-Cruz *et al.*, 2017). Da mesma forma ao encontrado para outros metabólitos como prolina e capsaicinoides, as condições ambientais do ano de 2018 também influenciaram o acúmulo de carotenoides (Figura 21b).

A coloração nas pimentas varia principalmente em função da composição de carotenoides na epiderme do fruto e pode ocorrer desde o amarelo, passando por tons alaranjados, vermelhos e marrom. Um estudo demonstrou que algumas cultivares de coloração vermelha apresentaram alto teor de  $\beta$ -caroteno, enquanto outras, alto teor de capsantina e ausência de  $\beta$ -caroteno (Guiffrida *et al.*, 2013). Embora algumas diferenças tenham sido observadas, o parâmetro de cor não parece ser afetado em função do tratamento ou do ano de cultivo (Figura 10b). Valores médios de 32,5 H° foram observados nas pimentas analisadas. Acunha *et al.* (2017) observaram valores médios de 35,6 H° em genótipos de *C. baccatum*.

Pimentas são boas fontes de ácido ascórbico. Nas cultivares de maior acúmulo o teor de ácido ascórbico pode chegar a em torno de 2 mg g<sup>-1</sup> em massa fresca de fruto (Kopta *et al.*, 2019). No presente estudo, o valor médio de ácido ascórbico total foi de 0.2 mg g<sup>-1</sup> em massa seca, considerando que os frutos tenham entre 85 e 90% de água, esses valores estão próximos dos relatos anteriores. Segundo os autores Kaur e Nayyar (2014), genótipos mais tolerantes a condições de estresse possuem teores mais altos de ácido ascórbico endógeno. Nesse sentido, o genótipo P337 (baixa pungência) acumulou maiores teores de ácido ascórbico em relação aos

demaís genótipos em ambos os tratamentos e anos de cultivo (Figura 22b). Porém o conteúdo de ácido ascórbico foi reduzido sob condição de déficit hídrico.

Embora o maior acúmulo de ácido ascórbico fosse esperado por ser um composto com potencial antioxidante, Kopta *et al.* (2020) também não observaram acúmulo significativo em cultivares de pimenta sob déficit hídrico. Esses autores relataram que as cultivares mais tolerantes possivelmente são as que não apresentam redução no teor de ácido ascórbico mesmo após aplicação mais prolongada da condição estressora. Com base nessas afirmações, o genótipo de média pungência P232 mostrou maior estabilidade entre os anos de cultivo e quanto à manutenção do conteúdo de ácido ascórbico sob déficit hídrico (Figura 22b).

Maiores teores de ácidos fenólicos foram observados no genótipo de maior pungência P232, principalmente os compostos ácido siringico e vanílico (Figura 24c e 24d). Esse mesmo genótipo apresentou sob déficit hídrico um acúmulo de ácido clorogênico 2,6 vezes maior que o tratamento controle, no ano de 2018 (Figura 24a). Os ácidos clorogênico e gálico e o flavonoide rutina já foram identificados anteriormente em pimentas *C. annuum* (Medina-Juárez *et al.*, 2012). Estrada *et al.* (2000) relataram que o amadurecimento nos frutos causa redução no teor de compostos fenólicos livres, sendo que estes estavam em maiores concentrações nos estádios iniciais de desenvolvimento.

O déficit hídrico promoveu aumento do teor de compostos fenólicos, principalmente para o ácido clorogênico, pois os demais compostos variaram em função do genótipo e ano de cultivo (Figura 24 e 25). Foi sugerido que o acúmulo de compostos fenólicos pode estar relacionado com mecanismo de defesa durante uma condição de estresse. Isso pode ser observado para condição de déficit hídrico em frutos e folhas tomateiros cereja (*Solanum lycopersicum* L.) (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2011; Al Hassan *et al.*, 2015), em folhas de *Amaranthus tricolor* (Sarker e Oba, 2018), em amendoazeiros (*Arachis hypogaea* L.) (Aninbon *et al.*, 2016) e em pimentas (*Capsicum annuum*) (Rodríguez-Calzada *et al.*, 2019). Nesse sentido, o ácido clorogênico parece ser o principal antioxidante entre os compostos fenólicos na defesa do metabolismo de pimentas *C. baccatum* em condições estressoras causadas por déficit hídrico.

## 8 Considerações finais

Embora fosse esperado o acúmulo de capsaicinoides em função do déficit hídrico, sua aplicação no estágio de amadurecimento dos frutos não induziu o acúmulo de capsaicinoides. Associado a isso esperava-se o aumento de transcritos do gene *Pun1* (capsaicina sintase) em resposta ao déficit hídrico, o que também não ocorreu. Avaliou-se fatores de transcrição associados a condições estressoras que pudessem estar controlando a expressão do gene *PUN1* via ligação aos elementos regulatórios de ação *cis*. Observou-se correlação positiva entre a expressão de *DREB1A* e o acúmulo de capsaicinoides no genótipo de baixa pungência, no entanto essa ocorrência não foi observada via expressão de *PUN1*, indicando que a ação do fator de transcrição está atuando de maneira independente desse gene.

A aplicação do déficit hídrico no estágio de amadurecimento dos frutos, afetou o metabolismo de aminoácidos e açúcares, demonstrando que os genótipos pungentes acumularam preferencialmente aminoácidos como osmorreguladores, o que não foi observado para o genótipo sem pungência. Alterações nos teores de compostos fenólicos e carotenoides foi observada em função da aplicação do déficit hídrico. Porém esses resultados foram dependentes do genótipo, sem estar relacionado com o grau de pungência dos frutos. O genótipo de média pungência se diferenciou dos demais genótipos quanto aos teores de aminoácidos, ácidos fenólicos e capsaicinoides. Assim, é possível que a presença desses compostos tenha contribuído para melhor tolerância de genótipo ao déficit hídrico.

## Referências bibliográficas

- ACUNHA, T. S.; CRIZEL, R. L.; TAVARES, I. B.; BARBIERI, R. L. PEREIRE, C. M. P.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, C. C. Bioactive compound variability in a Brazilian *Capsicum* pepper collection. **Crop Science**, v. 57, p. 1611-1623. 2017.
- AL HASSAN, M.; MARTÍNEZ FUERTES, M.; RAMOS SÁNCHEZ, F. J.; VICENTE, O.; BOSCAIU, M. Effects of salt and water stress on plant growth and on accumulation of osmolytes and antioxidant compounds in cherry tomato. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 43, n.1, p. 1-11. 2015.
- ANINBON, C.; JOGLOY, S.; VORASOOT, N.; PATANOTHAI, A.; NUCHADOMRONG, S.; SENAWONG, T. Effect of end of season water deficit on phenolic compounds in peanut genotypes with different levels of resistance to drought. **Food Chemistry**, v. 196, p.123-129. 2016.
- ANJUM, S. A.; FAROOQ, M.; XIE, X.; LIU, X.; IJAZ, M. F. Antioxidant defense system and proline accumulation enables hot pepper to perform better under drought. **Scientia Horticulturae**, v. 140, p. 66-73. 2012.
- ARANHA, B. C., HOFFMANN, J. F., BARBIERI, R. L., ROMBALDI, C. V., CHAVES, F. C. Untargeted metabolomic analysis of *Capsicum* spp. by GC-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 5, p. 439-447. 2017.
- ARCE-RODRÍGUEZ, M. L.; OCHOA-ALEJO, N. Biochemistry and molecular biology of capsaicinoid biosynthesis: recent advances and perspectives. **Plant Cell Reports**, v. 38, p. 1017-1030. 2019.
- ASHRAFI-DEHKORDI, E.; ALEMZADEH, A.; TANAKA, N.; RAZI, H. Meta-analysis of transcriptomic responses to biotic and abiotic stress in tomato. **PeerJ**, v. 6, e. 4631. 2018.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Method 970.64, Carotenes and xanthophylls in dried plant materials and mixed feeds**. Ed. 18TH, GAITHERSBURG, 2007.
- AZA-GONZÁLEZ, C.; NÚÑEZ-PALENIUS, H.G.; OCHOA-ALEJO, N. Molecular biology of capsaicinoid biosynthesis in chili pepper (*Capsicum* spp.). **Plant Cell Reports**, v. 30, p. 695-706. 2011.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-292. 1998.
- BARBIERI, R.L; NEITZKE, R.S. **Pimentas do gênero *Capsicum* – cor, fogo e sabor**. In: BARBIERI, R.L.; STUMPF, E.R.T. Origem e evolução de plantas cultivadas. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. p.727-745.



BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, v. 44, n. 3, p. 453-460. 2014.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil, The Hague**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BENNETT, D.J.; KIRBY, G.W. Constitution and biosynthesis of capsaicin. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, v. 4, p. 442-446. 1968.

BIANCHI, L.; GERMINO, G. H.; SILVA, M. A. adaptação das plantas ao déficit hídrico. **Acta Iguazu**, v. 5, n. 4, p. 15-32. 2016.

BOLARIN, M. C.; ESTAÑ, M. T.; CARO, M.; ROMERO-ARANDA, R.; CUARTERO, J. Relationship between tomato fruit growth and fruit osmotic potential under salinity. **Plant Science**, v. 160, p. 1153-1159. 2001.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254. 1976.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T., PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, p. 611-622. 2009.

CABANE, M.; AFIF, D.; HAWKINS, S. Lignins and abiotic stress. **Advances in Botanical Research**, v. 61, p. 219-262. 2012.

CHEVROT, R.; ROSEN, R.; HAUDECOER, E.; CIROU, A.; SHELP, B. J.; RON, E.; FAURE D. GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 19, p. 7460-7464. 2006.

CHO, Y. H.; YOO, S. D. Signaling role of fructose mediated by FINS1/FBP in *Arabidopsis thaliana*. **PLOS Genetics**, v. 7, n. 1, e. 1001263. 2011.

CHUANG, H.W.; HARNRAK, A.; CHEN, Y.C.; HSU, C.M. A harpin-induced ethylene-responsive factor regulates plant growth and responses to biotic and abiotic stresses. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 402, p. 414-420. 2010.

COYAGO-CRUZ, E.; CORELL, M.; STINCO, C. M.; HERNANZ, D.; MORIANA, A.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J. Effect of regulated deficit irrigation on quality parameters, carotenoids and phenolics of diverse tomato varieties (*Solanum lycopersicum* L.). **Food Research International**, v. 96, p. 72-83. 2017.

CRAMER, G. R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, v. 11, p. 163-177. 2011.

DE VOS, R. C.; MOCO, S.; LOMMEN, A.; KEURENTJES, J. J.; BINO, R. J.; HALL, R. D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. **Nature protocols**, v. 2, n. 4, p. 778-791. 2007

Delfine, S.; Tognetti, R.; Loreto F.; Alvino A. Physiological and growth responses to water stress in Field-grown bell pepper (*Capsicum annuum* L.). **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v.77, n. 6, p. 697-704, 2002.

EMBRAPA, 2019. **Pimenta (*Capsicum* spp.): Clima e irrigação**. Disponível em: [https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta\\_capsicum\\_spp/index.html](https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/Pimenta_capsicum_spp/index.html). Acesso em: 06/11/2019.

ESCALANTE-MAGAÑA, C.; AGUILAR-CAAMAL, L. F.; ECHEVARRÍA-MACHADO, I.; MEDINA-LARA, F.; CACH, L. S.; MARTÍNEZ-ESTÉVEZ, M. Contribution of glycine betaine and proline to water deficit tolerance in pepper plants. **Hortscience**, v. 54, n. 6, p. 1044-1054. 2019.

ESTRADA, B.; BERNAL, M. A.; DÍAZ, J.; POMAR, F.; MERINO, F. Fruit development in *Capsicum annuum*: Changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p. 6234-6239. 2000.

**FAOSTAT** (Food and Agriculture Organization of the United Nations - Statistics Division). Production/crops: Chillies and peppers. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> Acessado em: 08/10/2019.

FAZELI, F.; GHORBANLI, M.; NIKNAM, V. Effect of drought on biomass, protein content, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in two sesame cultivars. **Biologia Plantarum**, v. 51, p. 98-103. 2007.

FLORENCIO-ORTIZ, V.; SELLEÂS-MARCHART, S.; ZUBCOFF-VALLEJO, J.; JANDER, G.; CASAS J. L. Changes in the free amino acid composition of *Capsicum annuum* (pepper) leaves in response to *Myzus persicae* (green peach aphid) infestation. A comparison with water stress. **PLOS One**. 2018.

FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y.; TAKAHASHI, F.; NARUSAKA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 436-442. 2006.

GASPAR, M. Aquaporins: from water channels to multifunctional transporters in plants. **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, n. 4, p. 481-491. 2011.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314. 1977.

GIUFFRIDA, D.; DUGO, P.; TORRE, G.; BIGNARDI, C.; CAVAZZA, A.; CORRADINI, C.; DUGO, G. Characterization of 12 *Capsicum* varieties by evaluation of their carotenoid profile and pungency determination. **Food Chemistry**, v. 140, p. 794-802. 2013.

GONG, Y.; RAO, L.; YU, D. **Abiotic Stress in Plants - chapter 6**. Agricultural Chemistry, 2013. Disponível: <http://dx.doi.org/10.5772/55865>. Acesso em: 07/11/2019.

GRANT, O. M.; JOHNSON, A. W.; DAVIES, M. J.; JAMES, C. M.; SIMPSON, D. W. Physiological and morphological diversity of cultivated strawberry (*Fragaria x ananassa*) in response to water deficit. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 3, p. 264-272. 2010.

GRIEVE, C.M.; GRATTAN, S.R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant and Soil, The Hague**, v. 70, p. 303-307. 1983.

GURUNG, T.; TECHAWONGSTIEN, S.; SURIHARN, B.; TECHAWONGSTIEN, S. Impact of environments on the accumulation of capsaicinoids in *Capsicum* spp. **HortScience**, v. 46, p. 1576-1581. 2011.

GURUNG, T.; TECHAWONGSTIEN, S.; SURIHARN, B.; TECHAWONGSTIEN, S.; Stability analysis of yield and capsaicinoids content in chili (*Capsicum* spp.) grown across six environments. **Euphytica**, v. 187, p. 11-18. 2012.

HONG, J. P.; KIM, W. T. Isolation and functional characterization of the *Ca-DREBLP1* gene encoding a dehydration-responsive element binding-factor-like protein 1 in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang). **Planta**, v. 220, p. 875-888. 2005.

HSIEH, T. H.; LEE, J. T.; YANG, P. T.; CHIU, L. H.; CHARNG, Y. Y.; WANG, Y. C.; CHAN, M. T. Heterology expression of the Arabidopsis C-repeat/ dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. **Plant Physiology**, v. 129, p. 1086-1094. 2002a.

HSIEH, T.H.; LEE, J.T.; CHARNG, Y.Y.; CHAN, M.T. Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. **Plant Physiology**, v. 130, p. 618-626. 2002b.

HUSSAIN SS, KAYANI MA, AMJAD M. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought tolerance in plants. **Biotechnology Progress**, n. 27, n. 2, p. 297-306. 2011.

INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v. 92, p. 185-202. 2005.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª Ed., 1ª Ed. Digital. São Paulo, 2008.

ITO, Y.; KATSURA, K.; MARUYAMA, K.; TAJI, T.; KOBAYASHI, M.; SEKI, S.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Functional analysis of rice *DREB1/CBF* type transcription factors involved in cold responsive gene expression in transgenic rice. **Plant Cell Physiology**, v. 47, p. 141-153. 2006.

IWAI, K.; SUZUKI, T.; FUJIWAKE, H. Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues, in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different growth stages after flowering. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 43, n. 12, p. 2493-2498, 1979.

JAMAUX, I.; STEINMETZ, A.; BELHASSEN, E. Looking for molecular and physiological markers of osmotic adjustment in sunflower. **New Phytologist**, v. 137, n. 1, p. 117-127. 1997.

JIN, J. H.; WANG, M.; ZHANG, H. X.; KHAN, A.; WEI, A. M.; LUO, D. X.; GONG, Z. H. Genome-wide identification of the AP2/ERF transcription factor family in pepper (*Capsicum annuum* L.). **Genome**, v. 61, n. 9, p. 663-674. 2018.

KARABUDAK, T.; BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. Glycine betaine protects tomato (*Solanum lycopersicum*) plants at low temperature by inducing fatty acid desaturase7 and lipoxygenase gene expression. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 1401-1410. 2014.

KAUR, R.; NAYYAR, H. **Ascorbic acid: A potent defender against environmental stresses**. In Oxidative Damage to Plants; Ahmad, P., Ed.; Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2014. p. 235-287.

KAVAR, T.; MARAS, M.; KIDRIC, M.; JELKA SUS-TAR-VOZLIC. J.; MEGLIC, V. Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. **Molecular Breeding**, v. 21, p. 159-172. 2008.

KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 88, n. 3, p. 424-438. 2005.

KEYHANINEJAD, N.; CURRY, J.; ROMERO, J.; O'CONNELL, M. A. Fruit specific variability in capsaicinoid accumulation and transcription of structural and regulatory genes in *Capsicum* fruit. **Plant Science**, v. 215-216, p. 59-68. 2014.

KIM, J. C.; LEE, S. H.; CHEONG, Y. H.; YOO, C. M.; LEE, S. I.; CHUN, H. J.; YUN, D. J.; HONG, J. C.; LEE, S. Y.; LIM, C. O.; CHO, M. J.; A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. **Plant Journal**, v. 25, p. 247-259. 2001.

KLAY, I.; PIRRELLO, J.; RIAHI, L.; BERNADAC, A.; CHERIF, A.; BOUZAYEN, M.; BOUZID, S. Ethylene Response Factor *Sl-ERF.B.3* is responsive to abiotic stresses and mediates salt and cold stress response regulation in tomato. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1-12. 2014.

KLIEBER, A. **Paprika spice production**. In: Dris, R., *et al.* Crop management and postharvest handling of horticultural products, Volume I - Quality management. Science Publishers, Enfield, 2001. p. 133-156.

KOEDA, S.; SATO, K.; SAITO, H.; NAGANO, A. J.; YASUGI, M.; KUDOH, H.; TANAKA, Y. Mutation in the putative ketoacyl-ACP reductase *CaKR1* induces loss of pungency in *Capsicum*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, p. 65-80. 2019.

KOPTA, T.; SEKARA, A.; POKLUDA, R.; FERBY, V.; CARUSO, G. Screening of chilli pepper genotypes as a source of capsaicinoids and antioxidants under conditions of simulated drought stress. **Plants**, v. 9, p. 364-380. 2020.

KOPTA, T.; ŠLOSÁR, M.; ANDREJIOVÁ, A.; JURICA, M.; POKLUDA, R. The influence of genotype and season on the biological potential of chilli pepper cultivars. **Folia Horticulturae**, v. 31, p. 121-126. 2019.

KORKMAZA, A.; SIRIKÇI, R.; KOCAÇINAR, F.; DEGER, Ö.; DEMIRKIRIAN, A. R. Alleviation of salt-induced adverse effects in pepper seedlings by seed application of glycinebetaine. **Scientia Horticulturae**, v. 148, p. 197-205. 2012.

KRAUS, T.E.; MCKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, n. 4, p. 570-576. 1995.

Lang, Y.; Kisaka, H.; Sugiyama, R.; Nomura, K.; Morita, A.; Watanabe, T.; Tanaka, Y.; Yazawa, S.; Miwa, T. Functional loss of pAMT results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogs, in *Capsicum annuum* cv. CH-19 sweet. **Plant Journal**, v. 59, p. 953-961. 2009.

LANNES, S. D.; FINGER, F. L.; SCHUELTER, A. R.; CASALI, V. W. D. Growth and quality of Brazilian accessions of *Capsicum chinense* fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 266-270. 2007.

LATA, C.; BHUTTY, S.; BAHADUR, R. P.; MAJEE, M.; PRASAD, M. Association of a SNP in a novel DREB2-like gene SiDREB2 with stress tolerance in foxtail millet [*Setaria italica* (L.)]. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 10, p. 3387-3401. 2011.

LATA, C.; PRASAD, M. Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 14, p. 4731-4748. 2011.

LECOMPTE, F.; NICOT, P. C.; RIPOLL, J.; ABRO, M. A.; RAIMBAULT, A. K.; LOPEZ-LAURI, F.; BERTIN, N. Reduced susceptibility of tomato stem to the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* is associated with a specific adjustment of fructose content in the host sugar pool. **Annals of Botany**, v. 119, n. 5, p. 931-943. 2017.

LEE, J.; HONG, J.; OH, S.; LEE, S.; CHOI, D.; WOO, T. K. The ethylene-responsive factor like protein 1 (*CaERFLP1*) of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) interacts in vitro with both GCC and *DRE/CRT* sequences with different binding affinities:

Possible biological roles of *CaERFLP1* in response to pathogen infection and high salinity conditions in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, v. 55, n. 1, p. 61-81. 2004.

LEE, K. H.; PIAO, H. L.; KIM, H. Y.; CHOI, S. M.; JIANG, F.; HARTUNG, W.; HWANG, I.; KWAK, J. M.; LEE, I. J.; HWANG, I. Activation of glucosidase via stress-induced polymerization rapidly increases active pools of abscisic acid. **Cell**, v. 126, p. 1109-1120. 2006.

LEETE, E.; LOUDEN, M.C.L. Biosynthesis of capsaicin and dihydrocapsaicin in *Capsicum annuum*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, p. 6837-6841. 1968.

LIANG, X.; ZHANG, L.; NATARAJAN, S. K.; BECKER, D. F. Proline mechanisms of stress survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 9, p. 998-1011. 2013.

LICHTENTHALER, H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 50, p. 47-50. 1999.

LISEC, J.; SCHAUER, N.; KOPKA, J.; WILLMITZER, L.; FERNIE, A.R. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. **Nature Protocols**, v. 1, p. 387-396. 2006.

LIU, G.; KASUGA, M.; SAKUMA, Y.; ABE, H.; MIURA, S.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 10, p. 1391-1406. 1998.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408. 2001.

MÄKELÄ, P.; JOKINEN, K.; KONTTURI, M.; PELTONEN-SAINIO, P.; PEHU, E.; SOMERSALO, S. Foliar application of glycinebetaine - a novel product from sugar beet - as an approach to increase tomato yield. **Industrial Crops and Products**, v. 7, p. 139-148. 1998.

MÄKELÄ, P.; KÄRKKÄINEN, J.; SOMERSALO, S. Effect of glycinebetaine on chloroplast ultrastructure, chlorophyll and protein content, and RuBPCO activities in tomato grown under drought or salinity. **Biologia Plantarum**, v. 43, p. 471-475. 2000.

MARTIN, F.D.; SANTIAGO, J.; COOK, A.A. The peppers, *Capsicum* species. **Agricultural Research**, v. 16, p. 200-218. 1979.

MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C.; MARTÍNEZ, V.; CARVAJAL, M. Osmotic adjustment, water relations and gas exchange in pepper plants grown under NaCl or KCl. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, p. 161-174. 2004.

MARUYAMA, K.; TAKEDA, M.; KIDOKORO, S.; YAMADA, K.; SAKUMA, Y.; URANO, K.; FUJITA, M.; YOSHIWARA, K.; MATSUKURA, S.; MORISHITA, Y.; SASAKI, R.; SUZUKI, H.; SAITO, K.; SHIBATA, D.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. **Plant Physiology**, v. 150, p. 1972-1980. 2009.

MEDINA-JUÁREZ, L. Á.; MOLINA-QUIJADA, D. M. A.; DEL TORO SÁNCHEZ, C. L.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; GÁMEZ-MEZA, N. Antioxidant activity of peppers (*Capsicum annuum* L.) extracts and characterization of their phenolic constituents. **Interciencia**, v. 37, n. 8, p. 588-593. 2012.

MIBEI, E. K.; OWINO, W. O.; AMBUKO, J.; GIOVANNONI, J. J.; ONYANGO, A. N. Metabolomic analyses to evaluate the effect of drought stress on selected African Eggplant accessions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 1, p. 205-216. 2018.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880. 1981.

NWOKEM, C.O.; AGBAJI, E.B.; KAGBU, J.A.; EKANEM, E.J. Determination of capsaicin content and pungency level of five different peppers grown in Nigeria. **New York Science Journal**, v. 3, n. 9, p.17-21. 2010.

OH, S. J.; SONG, S. I.; KIM, Y. S.; JANG, H. J.; KIM, S. Y.; KIM, M.; KIM, Y. K.; NAHM, B. H.; KIM, J. K. Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. **Plant Physiology**, v. 138, p. 341-351. 2005.

OLIVEIRA, M. A. J. D.; BOVI, M. L. A.; MACHADO, E. C.; GOMES, M. M. D. A.; HABERMANN, G.; RODRIGUES, J. D. Fotossíntese, condutância estomática e transpiração em pupunheira sob deficiência hídrica. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 1, p. 59-63. 2002.

PAN, Y.; SEYMOUR, G. B.; LU, C.; HU, Z.; CHEN, X.; CHEN, G. An ethylene response factor (*ERF5*) promoting adaptation to drought and salt tolerance in tomato. **Plant Cell Reports**, v. 31, p. 349-360. 2012.

PARK, E. J.; JEKNIC, Z.; CHEN, T. H. H. Exogenous application of glycinebetaine increases chilling tolerance in tomato plants. **Plant Cell Physiology**, v. 47, n. 6, p. 706-714. 2006.

PARK, Y. J.; NISHIKAWA, T.; MINAMI, M.; NEMOTO, K.; IWASAKI, T.; MATSUSHIMA, K. A low-pungency S3212 genotype of *Capsicum frutescens* caused by a mutation in the putative aminotransferase (p-AMT) gene. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 290, n. 6, p. 2217-2224. 2015.

PELLEGRINESCHI, A.; REYNOLDS, M.; PACHECO, M.; BRITO, R. M.; ALMERAYA, R.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; HOISINGTON, D. Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. **Genome**, v. 47, p. 493-500. 2004.

PERIN, E. C.; CRIZEL, R. L.; GALLI, V.; MESSIAS, R. S.; ROMBALDI, C. V.; CHAVES, F. C. Extraction and quantification of abscisic acid and derivatives in strawberry by LC-MS. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 2547-2552. 2018.

PHIMCHAN, P.; CHANTHAI, S.; BOSLAND, P. W.; TECHAWONGSTIEN, S. Enzymatic changes in phenylalanine ammonia-lyase, cinnamic-4-hydroxylase, capsaicin synthase, and peroxidase activities in capsicum under drought stress. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 29, p. 7057-7062. 2014.

PHIMCHAN, P.; TECHAWONGSTIEN, S.; CHANTHAI, S.; BOSLAND, P. W. Impact of drought stress on the accumulation of capsaicinoids in *Capsicum* cultivars with different initial capsaicinoid levels. **Hortscience**, v. 47, n. 9, p. 1204-1209. 2012.

PIMENTA, J. A. **Relações Hídricas**. In: KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1-37.

POWERS, J. J.; SHINHOLSER, K. pH and buffering capacity of canned green peppercorns. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 1788-1789. 1979.

PRATELLI, R.; PILOT, G. Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 5535-5556. 2014.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RAI, V. K. Role of amino acids in plant responses to stresses. **Biologia Plantarum**, v. 45, p. 481-487. 2002.

RAO, G.; SUI, J.; ZENG, Y.; HE, C.; ZHANG, J. Genome-wide analysis of the AP2/ERF gene family in *Salix arbutifolia*. **FEBS Open Bio**, v. 5, p. 132-137. 2015.

RHODES, D.; HANSON, A. D. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. **Annual Reviews of Plant Biology**, v. 44, n. 1, p. 357-384. 1993.

RIBEIRO, C.S.C.; HENZ, G.P.; VILELA, N.J.; AMARO, G.B.; MELO W.F.; REIFSCHNEIDER, F.J.B. **Árvore do Conhecimento: Pimenta**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gn05zz5y02wx5ok0liq1mqmbc6m9w.html>. Acesso em: 24/01/2018.

RODRÍGUEZ-CALZADAA, T.; QIANB, M.; STRIDB, A.; NEUGARTC, S.; SCHREINERC, M.; TORRES-PACHECOA, I.; GUEVARA-GONZÁLEZA, R. G. Effect of UV-B radiation on morphology, phenolic compound production, gene expression, and subsequent drought stress responses in chili pepper (*Capsicum annuum* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 134, p. 94-102. 2019.

ROYS, R.L. **The Ethno-Botany of the Maya**. Reprinted 1976, Institute for the Study of Human Issues, Philadelphia, 1931.



RUFINO, M. DO S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, DE G. C.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS**. Fortaleza: Embrapa, Comunicado Técnico 128, 2007. 4p.

RUIZ-LAU, N.; MEDINA-LARA, F.; MINERO-GARCÍA, Y.; ZAMUDIO-MORENO, Y.; GUZMÁN-ANTONIO, A.; ECHEVARRÍA-MACHADO, I.; MARTÍNEZ-ESTÉVEZ, M. Water deficit affects the accumulation of capsaicinoids in fruits of *Capsicum chinense* Jacq. **Hortscience**, v. 46, n. 3, p. 487-492. 2011.

SAKUMA, Y.; LIU, G.; DUBOUZET, J. G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKIA, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 3, p. 998-1009. 2002.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E.; MORENO, D. A.; FERRERES, F.; RUBIO-WILHELMI, M. DEL M.; RUIZ, J. M. Differential responses of five cherry tomato varieties to water stress: Changes on phenolic metabolites and related enzymes. **Phytochemistry**, v. 72, n. 8, p. 723-729. 2011.

SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, E.; RUBIO-WILHELMI, M. M.; CERVILLA, L. M.; BLASCO, B.; RIOS, J. J.; ROSALES, M. A.; ROMERO, L.; RUIZ, J. M. Genotypic differences in some physiological parameters symptomatic for oxidative stress under moderate drought in tomato plants. **Plant Science**, v. 178, p. 30-40. 2010.

SARKER, U. & OBA, S. Drought stress enhances nutritional and bioactive compounds, phenolic acids and antioxidant capacity of Amaranthus leafy vegetable. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 258, p. 1-15. 2018.

SCHWACHTJE, J.; WHITCOMB, S. J.; FIRMINO, A. A. P.; ZUTHER, E.; HINCHA, D. K.; KOPKA, J. Induced, imprinted, and primed responses to changing environments: does metabolism store and process information? **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. 106, p. 1-13. 2019.

SCOVILLE, W. L. Note on *Capsicum*. **Journal of American Pharmaceutical Association**, v. 1, p. 453-454. 1912.

SHARMA, A.; SHAHZAD, B.; KUMAR, V.; KOHLI, S. K.; SIDHU, G. P.S.; BALI, A. S.; HANDA, N.; KAPOOR, D.; BHARDWAJ, R.; ZHENG, B. Phytohormones regulate accumulation of osmolytes under abiotic stress. **Biomolecules**, v. 9, n. 285, p. 1-36. 2019.

STEWART, C. JR.; KANG, B. C.; LIU, K.; MAZOUREK, M.; MOORE, S. L.; EUN, Y. Y.; KIM, B. D.; PARAN, I.; JAHN, M. M. The Pun1 gene for pungency in pepper encodes a putative acyltransferase. **Plant Journal**, v. 42, p. 675-688. 2005.

STOICA, R.M.; MOSCOVICI, M.; TOMULESCU, C.; BĂBEANU, N. Extraction and analytical methods of capsaicinoids - a review. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, p. 93-98. 2016.

SUNG, Y.; CHANG, Y. Y.; TING, N. L. Capsaicin biosynthesis in water-stressed hot pepper fruits. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, p. 35-42. 2005.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.- The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63-68. 1959.

SWEAT, K. G.; BROATCH, J.; BORROR, C.; HAGAN, K.; CAHILL, T. M. Variability in capsaicinoid content and Scoville heat ratings of commercially grown Jalapeño, Habanero and Bhut Jolokia peppers. **Food Chemistry**, v. 210, p. 606-612. 2016.

SZIDERICS, A. H.; OUFIR, M.; TROGNITZ, F.; KOPECKY, D.; MATUŠÍKOVÁ, I.; HAUSMAN, J. F.; WILHELM, E. Organ-specific defence strategies of pepper (*Capsicum annuum* L.) during early phase of water deficit. **Plant Cell Reports**, v. 29, p. 295-305. 2010.

TAHI, H.; WAHBI, S.; EL MODAFAR, C.; AGANCHICH, A.; SERRAJ, R. Changes in antioxidant activities and phenol content in tomato plants subjected to partial root drying and regulated deficit irrigation. **Plant Biosystems**, v. 142, n. 3, p. 550-562. 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. In: Fisiologia Vegetal. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TANAKA, Y.; HOSOKAWA, M.; MIWA, T.; WATANABE, T.; YAZAWA, S. Newly mutated putative-aminotransferase in non-pungent pepper (*Capsicum annuum*) results in biosynthesis of capsinoids, capsaicinoid analogues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1761-1767. 2010.

UNO, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 11632-11637. 2000.

URBAN, L.; WHITE, J.P.; NAGY, I. Molecular structure of transient receptor potential vanilloid type 1 ion channel (TRPV1). **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, p. 115-121. 2011.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, v. 151, p. 59-66. 2000.

VINCI, G.; ROT, F.; MELE, G. Ascorbic acid in fruits: a liquid chromatographic investigation. **Food Chemistry**, v. 53, p. 211-214. 1995.

WAN, H.; YUAN, W.; RUAN, M.; YE, Q.; WANG, R.; LI, Z.; ZHOU, G.; YAO, Z.; ZHAO, J.; LIU, S.; YANG, Y. Identification of reference genes for reverse transcription quantitative real-time PCR normalization in pepper (*Capsicum annuum*

L.). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 416, p. 24-30. 2011.

WANG, Q.; DING, T.; ZUO, J.; GAO, L.; FAN, L. Amelioration of postharvest chilling injury in sweet pepper by glycine betaine. **Postharvest Biology and Technology**, v. 112, p.114-120. 2016.

YILDIZLI, A.; ÇEVİK, S.; ÜNYAYAR, S. Effects of exogenous myo-inositol on leaf water status and oxidative stress of *Capsicum annuum* under drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, p. 122. 2018.

YU, W.; ZHAO, R.; WANG, L.; ZHANG, S.; LI, R.; SHENG, J.; SHEN, L. ABA signaling rather than ABA metabolism is involved in trehalose-induced drought tolerance in tomato plants. **Planta**, v. 250, n. 2, p. 643-655. 2019

ZENG, Y.; YANG, T.; RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 20, p. 417a-417e. 2002.